

Tesis Doctoral

Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide Mallophora ruficauda (Diptera: Asilidae)

Crespo, José E.

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Crespo, José E.. (2011). Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide Mallophora ruficauda (Diptera: Asilidae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Crespo, José E.. "Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide Mallophora ruficauda (Diptera: Asilidae)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Ecología y fisiología del comportamiento de localización del
hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda*
(Diptera: Asilidae)**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

José E. Crespo

Director de Tesis: Dra. Marcela K. Castelo
Lugar de trabajo: Grupo de Investigación en Ecofisiología de Parasitoides
Departamento de Ecología, Genética y Evolución - FCEyN, UBA

Consejero de Estudios: Dr. Juan C. Reboreda

Buenos Aires, mayo 2011

RESUMEN

Ecología y fisiología del comportamiento de localización del hospedador en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Autor: Lic. José E. Crespo

Director: Dra. Marcela K. Castelo

Los insectos en su hábitat viven en contacto con una variedad de estímulos de diferente modalidad que tienen influencia sobre sus comportamientos. La búsqueda de alimento es una actividad de suma importancia donde el esfuerzo se concentra en encontrar los alimentos con el mayor retorno energético y el menor riesgo. Los parasitoides son insectos que necesitan de los hospedadores para alimentarse y es por esto que la búsqueda de hospedadores en este caso es considerada como una búsqueda de alimento. El moscardón cazador de abejas, *Mallophora ruficauda* es una de las plagas más importantes de la apicultura que afecta a la región pampeana argentina y es un parasitoide solitario de algunas especies de coleópteros de la familia Scarabaeidae. En estado adulto es depredador de insectos como abejas melíferas y otros himenópteros, mientras que en estado larvario parasita principalmente a las larvas de tercer estadio (gusanos blancos del suelo) de *Cyclocephala signaticollis*. Las hembras depositan sus huevos fuera del hospedador en desoves, utilizando vegetación herbácea y sustratos artificiales. En una primera etapa del proceso de localización del hospedador las hembras seleccionan la altura de los sitios de oviposición y este comportamiento contribuye a maximizar la dispersión de las larvas por el viento. Una vez en el suelo, la larva parasitoide muda al segundo estadio y comienza a buscar activamente al hospedador a través de la detección y seguimiento de claves químicas originadas en el intestino posterior del gusano blanco. Se desconocen, sin embargo, los órganos de las larvas involucrados en la detección del hospedador y el mecanismo que utilizan durante esta etapa. Se ha observado en la naturaleza que el superparasitismo es frecuente y que el 50% de los hospedadores parasitados se encuentra atacado por más de una larva. En esta Tesis se estudiaron aspectos ecológicos y fisiológicos del comportamiento de localización del hospedador en la larva del parasitoide *M. ruficauda*, particularmente la influencia de factores internos y externos sobre las decisiones de búsqueda, detección, orientación, aceptación y uso de hospedador. Considerando que esta especie de parasitoide es solitaria y que el superparasitismo sería desventajoso, se estudió si las larvas de *M. ruficauda* tienen la capacidad de detectar hospedadores previamente parasitados y las condiciones mediante las cuales el superparasitismo es una estrategia ventajosa, evaluando la capacidad de orientarse,

discriminar y parasitar hospedadores de distinta calidad. En cuanto a la búsqueda, se encontró que la larva de segundo estadio posee sensilias en los palpos maxilares que intervienen en la detección y en la orientación del parasitoide hacia su hospedador. Luego, se determinó que la larva de *M. ruficauda* tiene la capacidad de discriminar el estadio y estado de parasitismo de *C. signaticollis* por medio de claves químicas. Sin embargo, existen factores como la edad de la larva y la densidad de competidores coespecíficos en el suelo previa al parasitismo que modifican la respuesta del parasitoide, provocando una orientación positiva hacia hospedadores sub-óptimos y su posterior aceptación. En particular, las larvas jóvenes mantenidas en una densidad alta de competidores coespecíficos se orientaron y aceptaron a hospedadores subóptimos de estadio II sanos y de estadio III monoparasitados de *C. signaticollis*. Por otra parte, se encontró también que el cambio en las condiciones ambientales, particularmente un descenso brusco de la presión ambiental, tienen una marcada influencia en el comportamiento de búsqueda del hospedador provocando una disminución en el desplazamiento de las larvas de *M. ruficauda*. Por último, se encontró que *M. ruficauda* hace uso del hospedador de manera variable durante su desarrollo larval, donde el primer y el quinto estadio son independientes y el segundo y tercer estadio larval son totalmente dependientes del hospedador para completar su desarrollo. Por último, en cuanto el cuarto estadio larval se encontró que hace un uso parcial del hospedador y es durante esta fase donde el parasitoide lo mata. En conclusión, en esta Tesis se estudiaron los mecanismos que influyen sobre el proceso de parasitismo en *M. ruficauda*. La larva de este parasitoide posee diversas estrategias durante su fase larvaria, que le permiten incrementar su éxito reproductivo a través del parasitismo exitoso, como ser una prolongada supervivencia, la discriminación de la calidad del hospedador o la aceptación del superparasitismo. De manera general, el monoparasitismo es la situación ideal para este parasitoide solitario, y el superparasitismo puede entenderse como una estrategia favorable en escenarios con ciertas restricciones, las cuales en conjunto permiten aumentar las probabilidades de persistencia de la especie mediante el parasitismo exitoso por parte de la larva.

PALABRAS CLAVE: *Mallophora ruficauda*, Scarabaeidae, búsqueda del hospedador, aceptación del hospedador, estado-dependencia, éxito de parasitismo.

ABSTRACT

Ecology and physiology of the host location behaviour in the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae)

Author: Lic. José E. Crespo

Supervisor: Dra. Marcela K. Castelo

Insects live continuously in contact with a wide array of different modality stimuli that influence behaviours. Seeking for food is a central activity where effort is focused in finding food with the highest energy turnover and the lowest risk. Parasitoids feed on hosts, so in this case, host searching is considered to be food searching. The robber fly, *Mallophora ruficauda*, is one of the most important apiculture pests that affect the Argentinean Pampas, and it is a solitary parasitoid of some Scarabaeidae coleopteran species. As an adult, it predate on honey bees and other himenopterans, while during the larval stage, it mainly parasitizes third instar *Cyclocephala singaticollis* (white grubs) larvae. Females place their eggs away from the host, in egg-clutches, using the vegetation or artificial supports to oviposit. In the first stage of the host location process, females choose the height of oviposition places and this behaviour contributes to maximize wind dispersion of larvae. Once larvae drop to the ground, parasitoid larvae moult to the second instar and they begin to actively search for the host by detecting and following the chemical cues originated in the white grub's posterior intestine. It is unknown, however, which are the sensorial organs involved in the detection and the mechanism used along this stage. Field superparasitism has been studied and it has been found that 50% of parasitized hosts are attacked by more than one larva. In this Thesis, physiological and ecological aspects of host location in the parasitoid *M. ruficauda* were studied. Particularly, the influence of both internal and external factors over the searching, detection, orientation, acceptance and host use were studied. Given that this parasitoid species is solitary, it would be a disadvantage to superparasitize, so, the ability to detect previously parasitized hosts as well as the conditions under which superparasitism could be a favourable strategy were studied in *M. ruficauda* larvae, by evaluating its capability in orienting, discriminating and parasitising hosts of different quality. Regarding host location, it was found that second instar larvae have sensillas in their maxillary palps that are involved in the detection and orientation of the parasitoid to the host. Then, it was determined that *M. ruficauda* larvae are capable of discriminating the instar and

parasitism degree of *C. singacitollis* by means of chemical cues. However, there are some factors as age or density of coespecific competitors prior to parasitism that changes the parasitoid's response in a way that, under this scenario, they orientate and accept positively sub-optimal hosts. Particularly, short lived larvae raised in a high coespecific density environment orientated and accepted sub-optimal second instar and singly-parasitized third instar *C. signaticollis*. On the other hand, it was also found that changes in the environmental conditions, specifically a sudden drop in the barometric pressure, have a huge influence in the host seeking behaviour since, under this circumstances, *M. ruficauda* larvae decrease their displacement. Finally, it was found that *M. ruficauda* makes a variable host use along its larval development, where the first and fifth instars are independent but the second and third larval instars are completely dependent on the host to complete its development. Regarding the fourth larval instar, it was found that the parasitoid makes a partial use of the host and it is during this instar that the host is killed. In conclusion, in this Thesis the mechanisms influencing the parasitism process in *M. ruficauda* were studied. The larvae of this parasitoid has different strategies during the larval stage that allows it to increase their reproductive success through a successful parasitism, which are an extended survival, the discrimination of host quality, or the acceptance of superparasitism. In general, the single parasitism is the ideal scenario for this solitary parasitoid, but the superparasitism might be seen as a favourable strategy when there are restrictions, which can, altogether, increase the persistence probabilities of this species through a successful larval parasitism.

KEY WORDS: *Mallophora ruficauda*, Scarabaeidae, host seeking, state-dependence, parasitism success.

AGRADECIMIENTOS

- A Marcela Castelo. No solo por enseñarme a trabajar y mejorar día a día, sino por querer compartir la vida conmigo. Gracias.
- Al Dr. Claudio Lazzari por haberme enseñado muchísimas cosas de los insectos y del quehacer de un biólogo. Por permitirme trabajar con él y haber abierto sus puertas siempre con total generosidad. Muchísimas gracias.
- Al Dr. Juan Corley por aceptar ser mi codirector de beca.
- Al Dr. Carlos Bernstein por haberme hecho formar parte de un proyecto de investigación internacional muy enriquecedor para mi formación. Por permitirme discutir tantas veces sobre el tan interesante mundo de los parasitoides.
- Al Dr. Juan Carlos Reboreda por permitirme comenzar mi Tesis en el laboratorio de Ecología y Comportamiento Animal.
- A Hernán y Euge, por haber compartido todos los días desde hace mucho tiempo y hacer de la rutina algo diferente. Gracias chicos, de verdad.
- A Gustavo y Paula que hicieron de este último y tormentoso tiempo algo muy alegre.
- A los chicos del grupo que siempre están aunque y hacen que la facultad sea un segundo hogar.
- A mi mamá y a Ignacio, que siempre me apoyaron y me levantaron en los momentos más difíciles de estos últimos tiempos. Solo puedo decir gracias y decir que si llegue hasa acá fue por su continuo aliento. Gracias.
- A mi hermano Guillermo, que a pesar de estar lejos, me ha apoyado y estimulado a mejorar siempre. Por continuar enseñándome como buen hermano mayor.
- A los jurados de esta Tesis, los doctores Patricia Folgarait, María Busch y Pablo Schilman, por aceptar evaluar el trabajo tan gentilmente.
- Al Departamento de Química Orgánica, a la Dra. Gabriela Cabrera y a la Lic. Gabriela Gallardo por el procesado químico de los extractos utilizados en la Tesis.
- A los apicultores: Jorge Lucía, Luis Arenas, Amalia Hernández, José Bianchi, Javier Guillem, Nélica Castelo, Irene Casagrande y Jorge Sanz por permitirnos realizar los muestreos necesarios con total libertad en sus colmenares.
- Al Servicio de Paz y Justicia (SERPAJ) - 'Aldea de los Niños por la Paz'. Sede Aldea Pilar: a la Sra. Norma Miranda y al Sr. Carlos Quinteros, sede Aldea Rodríguez y al Colmenar Escuela de Belén de Escobar: Sr. Marcelo Gianola por facilitarnos lugares de muestreo tan desinteresadamente.
- A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN-UBA) por la formación académica y el lugar de trabajo para realizar esta Tesis.

- Al Departamento de Ecología, Genética y Evolución por permitirme desarrollar las tareas de esta Tesis en sus dependencias. A las Secretarias, Mabel y Graciela, por haber estado siempre ayudando en absolutamente todo lo posible.
- A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Foncyt) por los Subsidios PICT 01-16724 a Marcela Castelo y PICT 01200 que facilitaron el financiamiento para llevar a cabo esta Tesis.
- Al CONICET por haberme otorgado las Becas de posgrado para poder llevar adelante esta Tesis y por el subsidio PIP 1597 a Marcela Castelo que facilitó parcialmente su financiamiento.
- Al CNRS de Francia por el proyecto PICS 4144 a Carlos Bernstein, que facilitó el financiamiento para adquirir parte de los equipos para realizar el trabajo.
- A la Universidad de Buenos Aires por el subsidio UBACyT X416 a Marcela Castelo que facilitó el financiamiento para llevar a cabo esta Tesis y por el otorgamiento de fondos para realizar una estadía corta en Francia para visitar el laboratorio de Claudio Lazzari.

a tti

ÍNDICE

Resumen.....	2
Abstract.....	4
Agradecimientos.....	6
Índice.....	9
Capítulo 1: Introducción General.....	11
La comunicación química en los insectos.....	12
Factores que influyen sobre el comportamiento de los insectos.....	14
Los parasitoides.....	15
Éxito de parasitismo en los parasitoides.....	16
A. Localización del hábitat.....	17
B. Localización del hospedador.....	18
C. Discriminación y aceptación del hospedador.....	19
D. Uso del hospedador.....	22
Factores que influyen en el proceso de localización del hospedador.....	23
Los parasitoides de la familia Asilidae.....	24
Biología del sistema de estudio.....	25
Biología del parasitoide <i>Mallophora ruficauda</i>	25
Biología de los hospedadores.....	30
Parasitismo de los hospedadores.....	32
Objetivos e hipótesis de investigación.....	33
Objetivo general.....	33
Preguntas particulares.....	33
Capítulo 2: Materiales y Métodos Generales.....	36
Recolección y mantenimiento de los insectos.....	37
Experimentos de olfatometría.....	37
A. Dispositivos experimentales y procedimientos.....	37
B. Obtención de estímulos del hospedador.....	40
Experimentos de aferramiento al hospedador.....	41
Capítulo 3: Mecanismos de orientación y órganos sensoriales involucrados en la localización del hospedador en <i>Mallophora ruficauda</i>.....	42
Introducción.....	43
Materiales y Métodos.....	45
Insectos.....	45
Las estructuras sensoriales y el mecanismo de orientación.....	45
Análisis estadístico.....	46
Resultados.....	46
Las estructuras sensoriales y el mecanismo de orientación.....	45
Discusión.....	50
Capítulo 4: Discriminación y aceptación del hospedador en <i>Mallophora ruficauda</i>.....	54
Introducción.....	55
Materiales y Métodos.....	58
Insectos.....	58
Discriminación del hospedador.....	58
Detección de coespecíficos.....	59
Detección del parasitoide por el hospedador.....	59
Aceptación del hospedador.....	59
Análisis estadístico.....	61
Resultados.....	61
Discriminación del hospedador.....	61
Detección de coespecíficos.....	62
Detección del parasitoide por el hospedador.....	63
Aceptación del hospedador.....	64
Discusión.....	64

Capítulo 5: Efecto de los factores externos, internos y la estado-dependencia en la orientación y aceptación del hospedador en <i>Mallophora ruficauda</i>.....	70
Introducción.....	71
Materiales y Métodos.....	74
Insectos.....	74
Orientación hacia hospedadores sub-óptimos.....	75
A. Grado de parasitismo.....	75
B. Estadio del hospedador.....	77
Aceptación del hospedador.....	78
Análisis estadístico.....	79
Resultados.....	80
Orientación hacia hospedadores sub-óptimos.....	80
A. Grado de parasitismo.....	80
Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica.....	80
Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos.....	81
B. Estadio del hospedador.....	83
Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica.....	83
Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos.....	84
Aceptación del hospedador.....	85
A. Grado de parasitismo.....	85
Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica.....	85
Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos.....	87
B. Estadio del hospedador.....	87
Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica.....	87
Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos.....	88
Discusión.....	89
Capítulo 6: Influencia de las condiciones ambientales sobre la orientación al hospedador en <i>Mallophora ruficauda</i>.....	97
Introducción.....	98
Variaciones de la presión atmosférica.....	99
Materiales y Métodos.....	101
Insectos.....	101
Influencia de la presión barométrica en la orientación hacia el hospedador.....	101
Análisis estadístico.....	102
Resultados.....	103
Discusión.....	104
Capítulo 7: Estrategia de uso del hospedador y rasgos de historia de vida en <i>Mallophora ruficauda</i>.....	106
Introducción.....	107
Materiales y Métodos.....	109
Insectos.....	109
Tasa de supervivencia estadio-específica y duración del estadio en presencia y ausencia de hospedadores.....	109
Análisis estadístico.....	111
Resultados.....	111
Tasa de supervivencia estadio-específica y duración del estadio en presencia y ausencia de hospedadores.....	111
Uso del hospedador.....	115
Discusión.....	116
Capítulo 8: Discusión General.....	121
Capítulo 9: Bibliografía.....	126

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

LA COMUNICACIÓN QUÍMICA EN LOS INSECTOS

Los insectos, como cualquier animal, se encuentran inmersos en un ambiente con una variedad de estímulos de diferente modalidad que tienen influencia sobre sus comportamientos. Desde el reconocimiento de coespecíficos y del sexo opuesto, de las características particulares del ambiente hasta el encuentro de alimento, están influenciados por claves químicas. A pesar que las sustancias químicas median una gran cantidad de comportamientos y que tienen efectos poderosos sobre ellos, es aceptado en general que el comportamiento en los insectos está controlado por más de un estímulo externo e interno (Harris y Foster 1995, Kennedy 1978).

Las claves químicas utilizadas por los insectos son compuestos químicos que median el intercambio de información entre individuos y se conocen con el nombre de infoquímicos. Estos se pueden agrupar según la identidad del emisor y receptor, así como también por el efecto (beneficioso/perjudicial/neutro) que tiene el infoquímico sobre los individuos involucrados en la interacción. Cuando el emisor y el o los receptor/es de la información pertenecen a la misma especie, estos compuestos se denominan feromonas (e.g. búsqueda de pareja, señales de alarma). Por su parte, los aleloquímicos son responsables del intercambio de información entre individuos de diferentes especies. Cuando en este tipo de interacción interespecífica el intercambio de información resulta beneficioso tanto el individuo emisor como el receptor se habla de sinomonas (e.g. los aromas florales y los polinizadores). En el caso en que solo el individuo emisor se beneficia se llaman alomonas (e.g. arañas boleadoras que atraen presas imitando sus feromonas sexuales). Cuando de la interacción resulta beneficiado sólo el individuo receptor se habla de kairomonas y el ejemplo típico lo constituyen los olores del hospedador para los insectos hematófagos y parasitoides (Nordlund y Lewis 1976, Dicke y Sabelis 1988, Vet y Dicke 1992).

La búsqueda de alimento es una actividad de suma importancia para los animales donde el esfuerzo se concentra en forrajear los alimentos con el mayor retorno energético y el menor riesgo. Los recursos alimenticios en general no se encuentran homogéneamente distribuidos en el hábitat,

sino que se encuentran agrupados en parches de distinta disponibilidad (Begon 2006). Así, los insectos tienden a intensificar la búsqueda en lugares donde la probabilidad de encontrar su alimento es mayor (Schowalter 2006). La Teoría de Forrajeo Óptimo trata sobre la optimización de la dieta, riesgo y eficiencia de forrajeo y dice que el comportamiento de forrajeo más eficiente de un animal es aquel seleccionado positivamente por la Selección Natural. Este comportamiento sería en teoría el que más contribuye a la maximización de su fitness o éxito reproductivo (Stephens y Krebs 1986, Schowalter 2006). Dado que los recursos brindan energía a los consumidores, es esperable que el animal que explote los mejores recursos sea el que obtenga una mejor recompensa. Los recursos pueden variar en su calidad dependiendo, por ejemplo, de si representan un elevado costo en tiempo de búsqueda o energía contenida. De esta manera los consumidores deberían maximizar la eficiencia de forrajeo concentrando los esfuerzos en explotar parches de alta recompensa hasta que el valor de ese parche disminuya hasta el valor de los otros parches de menor ganancia (Schowalter 2006). Una manera de mejorar la eficiencia de búsqueda es por medio de la orientación hacia claves indicadoras de la ubicación de los recursos.

Los consumidores afectan la distribución y abundancia de los recursos consumidos y viceversa. El caso particular de la depredación involucra a aquellos organismos que se alimentan sobre otro, estando este último vivo al comienzo del ataque (Begon 2006). Existe una clasificación funcional que agrupa a los consumidores en: depredadores, herbívoros, parásitos y parasitoides. Los depredadores son aquellos animales que atacan a una presa y la matan al instante. Es característico que a lo largo de la vida los depredadores consuman muchas presas. Los herbívoros también son consumidores pero a diferencia de los depredadores, estos no matan inmediatamente a las plantas de las que se alimentan. Los parásitos son consumidores que no matan a sus presas al alimentarse, sino que consumen parte de los tejidos sin producirle daños mayores. Por último, los parasitoides son consumidores que atacan a sus presas pero no las matan al instante, sino que lo hacen luego de un determinado tiempo. En muchas formas los parasitoides son organismos intermedios entre depredadores y parásitos: como depredadores matan al hospedador en su ataque pero, como parásitos, necesitan de un hospedador para desarrollarse y madurar (Godfray 1994). Tanto los parásitos como los parasitoides atacan pocas presas a lo largo de su vida y desarrollan una asociación íntima con la presa, la que es llamada hospedador (Begon 2006).

Así como muchos insectos se alimentan de néctar u otros insectos, los parasitoides son insectos que necesitan de los hospedadores para alimentarse al menos durante su estado larval. Es por esto que, en el caso de los parasitoides, la búsqueda de hospedadores es considerada como una búsqueda de alimento. Algunos insectos realizan una búsqueda de alimento al azar donde eventualmente encontrarán recursos. Sin embargo, la gran mayoría, responden a claves que son indicadoras de potenciales fuentes de alimento. La búsqueda de hospedadores en los parasitoides está mediada en la mayoría de los casos por compuestos químicos. Sin embargo, existen factores que pueden influenciar la percepción de estos químicos por los insectos. Por ejemplo, factores que modifiquen la concentración de los gradientes químicos en el aire o el agua así como los factores ambientales que afecten la dispersión de las corrientes de estos químicos pueden influir directamente sobre su percepción. Por otro lado, factores intrínsecos individuales del organismo receptor, como la sensibilidad a los olores, también puede influir en la manera en que se perciben o interpretan los químicos.

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LOS INSECTOS

Como se mencionó en la sección anterior la búsqueda de alimento es un comportamiento muy importante ya que tiene una incidencia directa en el fitness. Es por esto que los comportamientos que influyen directamente en el éxito de parasitismo deben estar bajo una fuerte presión de selección, de manera tal que los comportamientos están siendo moldeados y optimizados permanentemente (Wajnberg et al. 2008). Sin embargo, no siempre los animales exhiben comportamientos que se suponen óptimos. Esto se debe a que los animales se encuentran a su vez influenciados por factores externos e internos que provocan que las decisiones tomadas no sean las esperadas óptimamente (Wajnberg et al. 2008).

Los factores externos son aquellas condiciones que influyen sobre el comportamiento de los animales desde el ambiente, tales como la temperatura, humedad, luz, presión atmosférica y también

las condiciones de interacción con otros individuos, tales como su comportamiento o su presencia. Para los insectos en particular, la búsqueda del alimento o de hospedadores está fuertemente influenciada por estos factores (Bell et al. 1995). En los parasitoides se ha visto que un descenso en la presión atmosférica y de temperatura provoca un aumento en el tiempo de búsqueda en un parche de hospedadores (Roitberg et al. 1993, Amat et al. 2006). También se ha visto que una disminución en la duración del fotoperíodo influye sobre el tiempo de residencia en un parche (Roitberg et al. 1993). Por otro lado, los factores internos hacen referencia a las características del estado interno del individuo. El estado interno de un individuo es el conjunto de variables fisiológicas como la edad, el estado nutricional, la cantidad de reservas o carga de huevos. Estos factores influyen en forma directa sobre las decisiones que toman los individuos. Los comportamientos que dependen del estado de alguna de estas variables se conocen como estado-dependientes. Es decir que las decisiones comportamentales que toman los insectos dependen de su estado fisiológico y pueden cambiar al variar las condiciones. En los parasitoides, se ha visto que comportamientos como la oviposición, orientación hacia los hospedadores, aceptación de un hospedador o el superparasitismo son comportamientos estado-dependientes (Sirot et al. 1997, Ueno 1999, Javois y Tammaru 2006). En todos estos casos, se vio que cuando los parasitoides se encuentran en un estado interno empobrecido, aceptan o se orientan hacia hospedadores de menor calidad que la óptima.

LOS PARASITOIDES

Los parasitoides son insectos cuyas larvas se alimentan del cuerpo de otro artrópodo, usualmente un insecto (el hospedador) el cual muere como resultado del parasitismo (Godfray 1994). En la actualidad se estima que los parasitoides representan el 20-25% de todas las especies de insectos (LaSalle y Gauld 1991, Godfray 1994). El parasitoidismo como forma de vida se encuentra representado en 7 órdenes de insectos: Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Trichoptera, Neuroptera y Strepsiptera (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Pennacchio y Strand 2006). El orden Hymenoptera es el grupo donde el parasitoidismo es más frecuente (c.a. 78% de las especies descritas). Por su parte, el orden Diptera concentra un 20% de las especies, comprendiendo estos dos órdenes la vasta mayoría de los parasitoides (Godfray 1994). A lo largo de la evolución la

aparición del parasitoidismo ocurrió una sola vez entre los himenópteros, pero entre los dípteros ha aparecido en repetidas ocasiones, dando lugar a la enorme diversidad en sus hábitos alimenticios, formas de encontrar y parasitar al hospedador y hábitats que ocupan (Feener y Brown 1997). Como resultado de la presión selectiva en la búsqueda de hospedadores se ha generado una gran variedad en las adaptaciones de los parasitoides. Debido a esto, diferentes criterios son tenidos en cuenta para clasificar a los parasitoides. Según el estado del hospedador que parasitan, se denominan parasitoides de huevos, de larvas, de pupas o de adultos. Según el comportamiento alimentario de la larva, pueden ser endoparasitoides cuando se desarrollan dentro del cuerpo del hospedador, o ectoparasitoides cuando viven externamente, aferrados al cuerpo mediante sus piezas bucales. Los parasitoides que producen un solo adulto por hospedador parasitado se denominan parasitoides solitarios, en oposición a los parasitoides gregarios, donde se desarrollan de 2 a varios miles de individuos a partir de un solo hospedador. Cuando un parasitoide ataca a un hospedador ya parasitado por una hembra de la misma especie se denominan superparasitoides, cuando la hembra es de una especie diferente multiparasitoides. Por último, cuando la hembra ataca a una larva parasitoide que se encuentra parasitando al hospedador se denominan hiperparasitoides. Los parasitoides que permiten que sus hospedadores continúen creciendo después del ataque se denominan koinobiontes, en oposición a los idiobiontes, donde la hembra parasitoide paraliza al hospedador y la larva lo consume rápidamente (Godfray 1994).

ÉXITO DE PARASITISMO EN LOS PARASITOIDES

El parasitismo exitoso es un proceso que se ha sido dividido en cuatro pasos jerárquicos y sucesivos: localización del hábitat, localización del hospedador, aceptación del hospedador y uso del hospedador (Godfray 1994, Brodeur y Boivin 2004). Este abordaje ha sido adoptado por la vasta mayoría de los autores que han realizado revisiones sobre este tema (Vinson 1976, 1984, 1985, van Alphen y Vet 1986). Existe otro modelo más dinámico propuesto por Lewis et al. (1990) y Vet et al. (1990) en el que proponen que los parasitoides deberían responder en mayor medida a los estímulos mas asociados con el hospedador. Esto significa que si un parasitoide es capaz de localizar al hospedador directamente, la localización del hábitat sería redundante. Este último modelo es un

avance a la visión estrictamente jerárquica del éxito de parasitismo, sin embargo, este modelo le quita importancia a estrategias que no sean respuestas comportamentales a estímulos químicos (Godfray 1994). En esta tesis se utilizó la visión más clásica del proceso de parasitismo ya que se estudiaron no solo las respuestas comportamentales a estímulos químicos sino también los comportamientos asociados a otros estímulos.

Existen muchos estudios respecto del éxito de parasitismo y se han encontrado diversas estrategias aunque existe una marcada diferencia entre los himenópteros y el resto de los parasitoides estudiados. En la mayoría de los himenópteros, es la hembra la que realiza las tres primeras etapas del parasitismo y parte de la cuarta depositando los huevos dentro o sobre el hospedador (Brodeur y Boivin 2004). Luego, es la larva la que realiza la manipulación del hospedador propiamente dicha. Por otra parte, en los dípteros, coleópteros, tricópteros y lepidópteros parasitoides (la minoría), es la larva la responsable de realizar desde la segunda etapa en adelante (Brodeur y Boivin 2004).

A. LOCALIZACIÓN DEL HÁBITAT

Cuando un parasitoide se enfrenta a la tarea de encontrar un hospedador sobre el cual dejar la descendencia (o parasitar), lo primero que debe ocurrir es localizar el hábitat donde éste se encuentra. A diferencia de muchos insectos nectívoros donde las flores desarrollan estrategias de atracción, los hospedadores se encuentran bajo una fuerte presión de selección para evitar ser encontrados. Debido a esto, la hembra parasitoide se debe valer de claves ambientales indirectas que indiquen la presencia del hospedador. En la mayoría de los casos, el parasitoide se vale de claves olfativas aunque también utilizan claves visuales (Wackers y Lewis 1999). Una de las principales claves utilizadas por los parasitoides es el olor del alimento de sus hospedadores. Otros utilizan olores emitidos por las plantas que son alimento de los hospedadores cuando estas son dañadas. Algunos también muestran respuestas innatas a claves importantes para el parasitoide a lo largo de su evolución, es decir, claves que son indicadores de la ubicación de los hospedadores y que se han mantenido estables a lo largo de la historia evolutiva del parasitoide (Vet et al. 2002).

A pesar que las claves indirectas permiten al parasitoide detectar la presencia del hospedador, estas no brindan información específica sobre su localización. Debido a que la selección sobre los hospedadores favorece el desarrollo de estrategias para permanecer inconspicuos mientras que los parasitoides desarrollan estrategias para evitar ser detectados, se genera una restricción entre la evolución de una búsqueda del hospedador directa a gran distancia provocando el uso de información no directamente relacionada con el hospedador. El valor informativo de un estímulo depende de dos factores: su fidelidad para indicar la presencia de hospedadores disponibles y su detectabilidad por parte del parasitoide. Estos dos factores se suponen inversamente correlacionados (Vet et al. 1995). De esta manera, en la localización del hábitat del hospedador es muy común que el parasitoide recurra a claves indirectas menos fiables pero más detectables.

B. LOCALIZACIÓN DEL HOSPEDADOR

La localización del hospedador es una etapa del proceso de parasitismo que ha sido muy estudiada y que involucra diversos comportamientos sucesivos como son la búsqueda y detección del hospedador y la orientación hacia este. Según Godfray (1994), existen tres categorías en las que se pueden clasificar a las estrategias de localización del hospedador según que claves utilizan los parasitoides: estímulos del microhábitat del hospedador o de la planta de la que estos se alimentan, claves asociadas con la presencia o con la actividad del hospedador y, por último, estímulos originados directamente por el hospedador. Las estrategias de localización del hospedador utilizadas por la mayoría de los himenópteros se pueden englobar en las dos primeras categorías, mientras que en el caso de los dípteros es muy común que estos hagan uso de los sistemas de comunicación de sus hospedadores durante la búsqueda (Feener y Brown 1997).

De los infoquímicos existentes, los aleloquímicos y más precisamente las kairomonas, son los que poseen mayor importancia para los parasitoides en el proceso de búsqueda de hospedadores (Lewis et al. 1990, Papaj y Vet 1990, Vet et al. 1990, Turlings et al. 1991b, Whitman y Eller 1992, Tumlinson et al. 1993b). Los parasitoides no solo responden a un tipo particular de aleloquímico, sino que tienen la capacidad de responder a diferentes mezclas de estos compuestos (Noldus 1989, Papaj y Vet 1990, Vet et al. 1990, Turlings et al. 1991b, Tumlinson et al. 1993b). En estos casos, los

parasitoides pueden conocer la ubicación de sus hospedadores en el ambiente no solo a través de los aleloquímicos asociados al mismo hospedador, sino también por los provenientes de sus actividades, de la planta de la que se alimentan, o de microorganismos asociados con el hospedador o su hábitat (Lewis et al. 1990, Vet et al. 1990, Turlings et al. 1991a, Whitman y Eller 1992, Steinberg et al. 1993, Tumlinson et al. 1993b).

Particularmente entre los dípteros, la localización del hospedador está mediada principalmente por kairomonas que actúan como indicadores de la ubicación de los hospedadores (Vinson 1984, Dicke y Sabelis 1988, Lewis y Martin 1990, Vet y Groenwold 1990, Vet et al. 1990, Udayagiri y Jones 1992, Steinberg et al. 1993, Tumlinson et al. 1993 a, b). Estas kairomonas, así como muchos otros estímulos, son detectadas por órganos sensoriales que se encuentran principalmente en la cabeza (Chapman 1998). Típicamente, las antenas son los órganos detectores de olores de los insectos adultos. Las antenas de los insectos cuentan con sensilias que son las estructuras sensoriales más características. Existe una amplia variedad de formas de sensilias así como de antenas, pero todas cumplen un rol importante como órganos sensoriales (Chapman 1998). En cuanto a las larvas, hay una mayor diversidad de órganos sensoriales, ya que hay grupos que poseen antenas pero otros poseen las estructuras sensoriales en otras estructuras cefálicas, como los palpos maxilares (Chapman 1998). Algunas sensilias son muy específicas para determinados olores, y los individuos pueden encontrar una fuente de olor por medio tanto de una orientación directa como por una búsqueda al azar (Kennedy 1977).

C. DISCRIMINACIÓN Y ACEPTACIÓN DEL HOSPEDADOR

Algunos parasitoides pueden detectar y distinguir el estado de parasitismo de sus hospedadores por medio de claves químicas, comportamiento denominado discriminación del hospedador (Roitberg y Mangel 1988). Se ha propuesto que existen presiones de selección sobre la discriminación del hospedador dado que hembras que sean capaces de discriminar a sus hospedadores podrían evitar desperdiciar huevos y tiempo (Godfray 1994, van Baaren et al. 1995, Royer et al. 1999). Existen dos modalidades de discriminación del hospedador: intra e interespecífica

(Mackauer 1990). La discriminación intraespecífica es la capacidad de reconocer hospedadores parasitados por coespecíficos (van Alphen y Visser 1990). Este comportamiento se ha descrito mayormente entre los himenópteros y en una menor medida entre los parasitoides dípteros (van Lenteren 1981, Mackauer 1990, van Alphen y Visser 1990, Brodeur y Boivin 2004). Por otro lado, la discriminación interespecífica es la capacidad de reconocer hospedadores parasitados por parasitoides de otras especies y ha sido demostrado en unas pocas especies, principalmente de himenópteros (Mackauer 1990, van Baaren et al. 1994).

La mayoría de los estudios de discriminación del hospedador se realizó con especies de parasitoides donde la hembra ovipone sobre o dentro del cuerpo del hospedador. Por otro lado, existen pocos trabajos donde se haya estudiado este comportamiento en especies donde la búsqueda del hospedador la realizan tanto la hembra como el primer estadio larval (Royer et al. 1999, Brodeur y Boivin 2004). Se han realizado estudios donde se ha determinado que las larvas del coleóptero *Aleochara bilineata* Gyllenhal (Coleoptera: Staphilinidae) son capaces de discriminar a sus hospedadores (discriminación intraespecífica) en cuanto al estado de parasitismo del mismo (Royer et al. 1999, Lizé et al. 2006). Sin embargo, en estos estudios se ha visto que la discriminación del hospedador está basada principalmente en claves químicas y parcialmente en claves físicas relacionadas con el agujero de entrada en el pupario (Royer et al. 1999, Brodeur y Boivin 2004). Es más, se ha determinado que las larvas de *A. bilineata* evitan el superparasitismo de hospedadores parasitados por individuos hermanos y primos cuando la relación genética proviene del lado paterno pero no así del lado materno (Lizé et al. 2006, 2007).

Históricamente, se ha asumido que la discriminación del hospedador en parasitoides con larvas que activamente buscan a su hospedador no es tan ventajosa como en aquellos donde la hembra realiza esta actividad, debido a que las larvas parasitoides poseen una limitada capacidad de dispersión en el ambiente (Feener y Brown 1997). Sin embargo, cuando el hospedador tiene una distribución agregada, la discriminación del hospedador en parasitoides cuyas larvas buscan activamente a su hospedador resulta ser ventajosa dado que podrían encontrar más de un hospedador en su vida (Brodeur y Boivin 2004, Feener y Brown 1997, Vet et al. 2002).

La capacidad de discriminar al hospedador es un comportamiento que permite a los parasitoides parasitar exitosamente al mejor hospedador disponible. Para los parasitoides solitarios, el mejor hospedador (i.e. aquel que provee la mayor energía al parasitoide) no debe haber sido parasitado y debe poseer un buen estado físico. Sin embargo, el superparasitismo puede ocurrir en parasitoides solitarios, generando una situación de competencia por los recursos (Godfray 1994, Brodeur y Boivin 2004). Se ha propuesto que el superparasitismo puede ser ventajoso en casos donde la hembra tiene una carga de huevos mayor a las oportunidades de oviposición antes de morir (time-limited) o cuando la oportunidad de sobrevivir al superparasitismo es lo suficientemente alta (Godfray 1994, Vet et al. 2002). En resumen, aquellos parasitoides capaces de discriminar el estado del hospedador podrían maximizar su fitness y tendrían una ventaja competitiva frente a parasitoides incapaces de discriminar al hospedador.

La detección y discriminación de un hospedador adecuado permiten a un parasitoide aumentar el éxito reproductivo de este. A su vez, el éxito reproductivo de un parasitoide depende fundamentalmente de dos tipos de recursos diferentes: los hospedadores, para obtener recompensas inmediatas en términos de fitness (en los parasitoides con oviposición sobre el hospedador), y los recursos metabólicos, que pueden extender el tiempo de supervivencia del parasitoide y así obtener más oportunidades de reproducción futuras (Lucchetta et al. 2007). En la mayoría de los parasitoides, los recursos metabólicos se originan de las reservas acumuladas en la etapa larval y también del alimento obtenido durante el estado adulto, que puede ser el mismo hospedador u otras fuentes (Jervis y Kidd 1986).

La discriminación en los parasitoides se ha estudiado mucho y ha sido tema de gran controversia en el pasado (Salt 1961, van Lenteren 1981, van Alphen y Visser 1990). Así es que luego de realizar observaciones comportamentales y de efectuar una gran cantidad de estudios experimentales en diversas especies de parasitoides, se pudo determinar que la discriminación del hospedador existe. En uno de esos estudios se abordó el problema observando si el parasitoide evitaba el superparasitismo y podía discriminar al hospedador mediante el análisis de la distribución

estadística de los huevos en los hospedadores (Godfray 1994). Esta manera de estudiar la discriminación presenta problemas en la interpretación ya que, en los parasitoides solitarios, si hay más de un huevo o larva por hospedador, es un claro signo de que ocurrió superparasitismo (Godfray 1994). Sin embargo, el superparasitismo no siempre se debe considerar como una falta de discriminación como ya hemos visto. Por otro lado, en los parasitoides gregarios, es más difícil determinar si hubo superparasitismo en el campo. Una manera indirecta de determinarlo es si se observan más huevos en un hospedador de los que una hembra puede ovipositar (van Alphen 1980).

D. USO DEL HOSPEDADOR

Esta etapa del parasitismo es la última del proceso y ocurre luego de que el hospedador ha sido aceptado. El parasitoidismo induce cambios tanto físicos como fisiológicos en el hospedador que son atribuidos tanto a las larvas como a los adultos de los parasitoides (Vinson y Iwantsch 1980). Estos cambios se han dividido de acuerdo al efecto que tienen sobre el hospedador. Puede ocurrir parálisis, cambios en el crecimiento, alimentación y desarrollo del hospedador (Vinson y Iwantsch 1980). Uno de los efectos más frecuentemente registrados es la modificación en la tasa de alimentación del hospedador. Hay casos en los que el parasitoide detiene completamente la alimentación de su hospedador o puede inhibir la pupación (Vinson y Iwantsch 1980). Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos por los cuales los parasitoides logran tomar control de su hospedador.

La manipulación del hospedador puede ser provocada tanto por la hembra al ovipositar como por la larva que se desarrolla directamente en el hospedador. Sin embargo, la manipulación del hospedador no se da siempre de la misma manera. El tipo de manipulación que puede realizar la hembra no es la misma que el grado de control que pueden ejercer las larvas parasitoides. Las larvas durante su proceso de desarrollo consumen los tejidos del hospedador a diferentes tasas y de diferente manera, dependiendo del estadio larval que se esté desarrollando. Debido a esto es importante conocer el uso que realiza el parasitoide sobre el hospedador y el grado de control que este ejerce en cada etapa del desarrollo.

FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE LOCALIZACIÓN DEL HOSPEDADOR

La capacidad de los parasitoides para encontrar alimento u hospedadores depende, entre otras cosas, de cuáles son los recursos limitados (tiempo restante antes de morir, huevos maduros, etc.). Esto da origen a lo que se conoce como un compromiso o trade-off entre estas dos actividades (Lucchetta et al. 2007). La solución a este trade-off requiere que el parasitoide sea capaz de adquirir e integrar la información acerca de la disponibilidad tanto del alimento como de los hospedadores. Por otro lado, el parasitoide modulará los comportamientos de búsqueda de alimento o de hospedador según su estado nutricional (Desouhant et al. 2005). La modulación de ambos comportamientos depende de la información interna (individuo-específica) y externa (ambiental) que el parasitoide percibe (Desouhant et al. 2005).

Existen modelos estado-dependientes donde se predice como los parasitoides administran el tiempo dedicado a la búsqueda de alimento y hospedadores. En estos estudios se determinó que la decisión óptima depende de la integración de tres tipos de información: la disponibilidad de alimento y hospedadores en el ambiente y de las reservas metabólicas del parasitoide (Sirot y Bernstein 1996, Tenhumberg et al. 2006). Por otro lado, las decisiones de los parasitoides también dependen de claves o condiciones externas como las condiciones ambientales. Existen pocos estudios, pero estos indican que cuando las condiciones ambientales son desfavorables o estas se vuelven inestables (disminución en la temperatura o en la presión atmosférica), los parasitoides modifican su comportamiento de forrajeo en un parche de hospedadores aumentando el tiempo de permanencia en el mismo (Roitberg et al. 1993, Amat et al. 2006).

En conclusión, el parasitismo de un hospedador consiste en una serie de etapas y existen comportamientos que permiten a los parasitoides optimizar los recursos disponibles de manera de incrementar su fitness. Sin embargo, los comportamientos que los parasitoides exhiben están modulados por condiciones tanto externas (ambientales) como internas (estado-dependencia). El papel que juega cada uno de estos elementos ha sido estudiado principalmente en alguna medida en

parasitoides himenópteros. Sin embargo, existe poca o ninguna información sobre la interacción e influencia de estos factores sobre el parasitismo en parasitoides dípteros.

LOS PARASITOIDES DE LA FAMILIA ASILIDAE

La familia Asilidae es uno de los grupos más numerosos en número de especies de insectos. Las especies de este grupo son comúnmente denominadas moscas ladronas y se caracterizan por ser depredadores de gran voracidad (Ruiz 1925). Los asílidos tienen distribución mundial y comprenden 530 géneros y 7003 especies descritas a la actualidad (Geller-Grimm 2010, Artigas et al. 1991, de Santis y Cornejo 1990). Los adultos se alimentan de insectos voladores mientras que las larvas son depredadores de las larvas subterráneas de escarabajos. Existen varios registros de larvas de Asilidae atacando larvas de Scarabaeidae (Davies 1919, Ritcher 1940). Se ha observado que el hábito depredador parece ser bastante común entre los Asilidae, dado que las larvas son capaces de alimentarse sobre cualquier insecto de cuerpo blando que encuentren, pero parecen tener una marcada selección hacia los Scarabaeidae cuando toman una presa (Clausen 1940). Algunas pocas especies, sin embargo, son consideradas parasitoides (Castelo y Lazzari 2004, Castelo 2003, Musso 1978, 1983, Clements y Bennett 1969, Copello 1922).

El género *Mallophora* Macquart tiene distribución exclusivamente en el continente americano, abarcando las regiones Neotropical y Neártica (Clements y Bennett 1969, Artigas y Angulo 1980). Contempla un total de 51 especies de las cuales 15 se encuentran en Argentina (Gemignani 1930). Las especies de *Mallophora* viven preferentemente en lugares bajos, a menudo con abundante vegetación (Artigas y Angulo 1980). Musso (1983) estudió los requerimientos ecológicos y nutritivos de las larvas y adultos de algunas especies de asílidos, y fue el primero en proponer que las especies del género *Mallophora* son verdaderos parasitoides.

BIOLOGÍA DEL SISTEMA DE ESTUDIO

Biología del parasitoide *Mallophora ruficauda*

Mallophora ruficauda Wiedemann 1828, conocido vulgarmente como moscardón cazador de abejas, es una especie endémica de Sudamérica y habitual de los pastizales de la Región Pampeana argentina, y es considerada una seria plaga de la apicultura (Rabinovich y Corley 1997; Figura 1.1a., tomada de Artigas y Angulo 1980). Los adultos se alimentan de insectos voladores como avispa, chinches y otras moscas, mostrando una gran afinidad por las abejas melíferas. Estos insectos atacan a las abejas en verano, en la temporada de su mayor actividad (Copello 1922, Werthein 1981, Rabinovich y Quiroga 1995; Figura 1.1b.). Durante el estado larval, *M. ruficauda* parasita a las larvas de los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae; Figura 1.1e.).

Mallophora ruficauda es un ectoparasitoide koinobionte solitario (solamente un individuo puede desarrollarse exitosamente por cada hospedador) pero es común el superparasitismo (Castelo 2003). Se desconoce si el parasitoide es capaz de discriminar el estado del hospedador de manera de evitar el superparasitismo y la consiguiente competencia. Por otro lado, el superparasitismo podría ser ventajoso en los casos donde la abundancia del hospedador es muy baja o cuando el estado nutricional del parasitoide es pobre.

Mallophora ruficauda tiene un ciclo de vida anual. Los adultos se encuentran presentes durante los meses de verano (diciembre-marzo), particularmente en los días soleados de intenso calor (Copello 1922). Existe un desfase entre la aparición de las larvas parasitoides y sus hospedadores. Mientras que las larvas parasitoides aparecen en el ambiente hacia fines de diciembre, el estadio del hospedador susceptible al parasitismo aparece hacia mediados de febrero. Las hembras depositan sus huevos (0,7 mm de longitud) en desoves (328 huevos en promedio, fecundidad 96,2%) fuera del hospedador sobre sustratos elevados tales como plantas herbáceas, alambrados de los campos, cables telefónicos o varas secas de vegetación (Figura 1.1c.; Copello 1922, Castelo 2003, Castelo y Corley 2004a). Se han realizado estudios sobre la preferencia de las hembras de *M. ruficauda* por los sitios

de oviposición y se logró determinar que la elección de sustratos elevados contribuye significativamente a maximizar la dispersión de las larvas y el monoparasitismo (Castelo et al. 2006). Particularmente, se determinó que el éxito de parasitismo de este parasitoide es máximo cuando los desoves son depositados a alturas comprendidas entre 1,25-1,50 mts (Castelo et al. 2006). Las hembras de *M. ruficauda* poseen una estrategia de producción de huevos sinovigénica extrema, es decir, las hembras emergen con todos los oocitos inmaduros, y la maduración se produce durante su vida reproductiva. El índice de ovigenia fue calculado para las hembras capturadas a campo de edad desconocida y es, en promedio, de 0,084, mientras que es de 0 para las hembras recién emergidas (Castelo, en preparación). El número promedio de oocitos maduros es de 330,5 y el número promedio de ovariolas por hembra es de 514,9. Además, el número de oocitos totales y el número de ovariolas de la hembra están correlacionados positivamente con el tamaño corporal (Nussenbaum 2007).

Mallophora ruficauda posee una estrategia de búsqueda compartida del hospedador donde dos fases del ciclo de vida están involucradas: el estado adulto y el larval. Se han realizado estudios donde se encontró una asociación positiva entre la presencia de *M. ruficauda* y la abundancia de hospedadores a la escala de pastizal (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010). Por otro lado, el encuentro real con el hospedador es llevado a cabo por las larvas del parasitoide en el cuerpo del suelo (Castelo 2003, Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2008). De esta manera, la hembra de *M. ruficauda* detecta a los hospedadores a una escala espacial grande y selecciona a la escala de pastizal el sitio de oviposición y luego, a una escala espacial mucho más pequeña, es la larva la encargada de la búsqueda propiamente dicha del hospedador. Luego que las larvas colonizan a los hospedadores, se produce a escala de pastizal un patrón de denso-independencia en el parasitismo, sugiriendo que las hembras no tendrían la capacidad de detectar exactamente donde están los hospedadores. En cambio, a escala de microhábitat en el suelo se produce un patrón de parasitismo denso-dependiente inverso, que indica que a medida que se incrementa el número de hospedadores la proporción de ellos que es parasitada es menor. Este patrón producido a menor escala sugiere que *M. ruficauda* posee un potencial limitado como regulador de las poblaciones de gusanos blancos (Castelo y Corley 2004b, Castelo y Corley 2010).

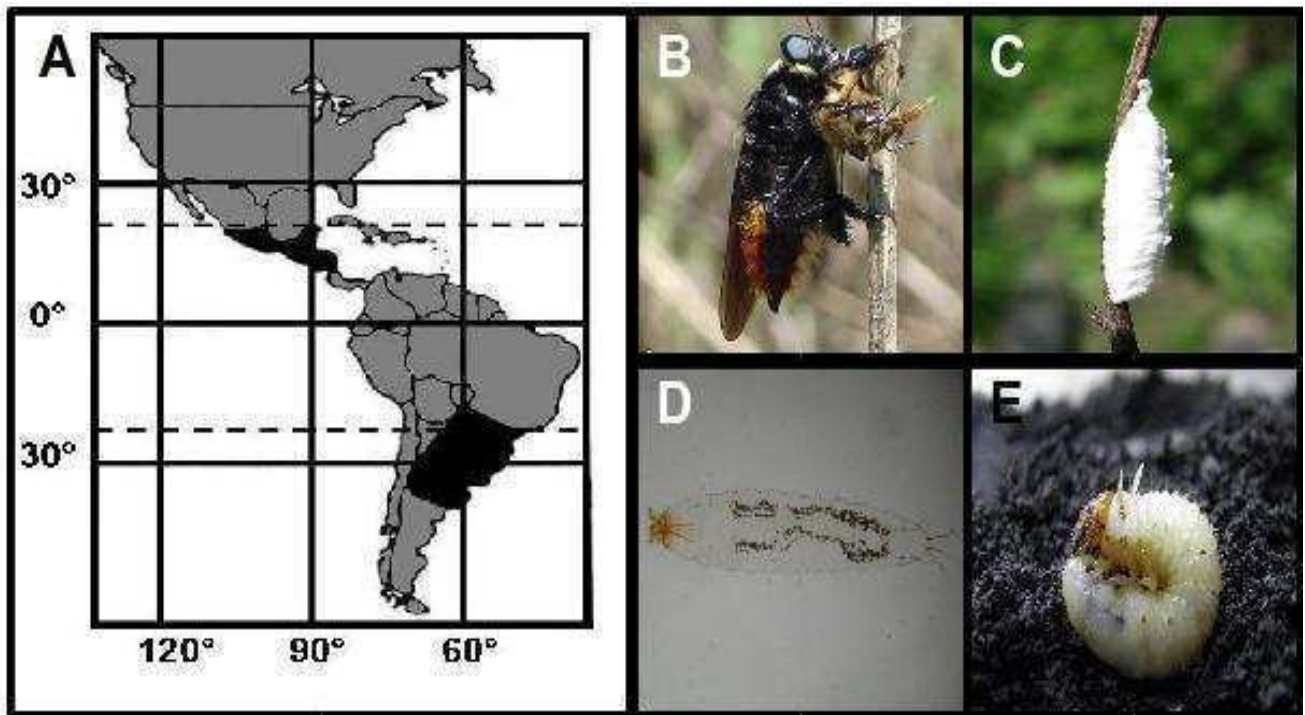


Figura 1.1. *Mallophora ruficauda*: a) Área de distribución mundial (en negro; tomado de Artigas y Angulo 1980). b) Hembra alimentándose de una abeja melífera. c) Desove. d) Larva de segundo estadio. e) Hospedador parasitado por una larva de segundo estadio. Fotografías: José E. Crespo.

Los huevos de *M. ruficauda* eclosionan luego de siete días de incubación en promedio. La eclosión de los huevos comienza a mediados de diciembre, sin embargo, la aparición del hospedador más susceptible al parasitismo se produce a mediados de febrero. A pesar de ello, las larvas de *M. ruficauda* logran sobrevivir con sus propias reservas corporales hasta que el hospedador se encuentra disponible en el campo (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2008). De cada huevo nace una pequeña larva (1,35 mm de longitud, 0,32 mm de ancho) que es dispersada por acción del viento cayendo al suelo a determinada distancia del sitio de oviposición (Figura 1.2.; Castelo 2003). Una vez en el suelo, las larvas se entierran rápidamente evitando de esta manera la desecación. Se observó que las larvas nacidas tempranamente en la temporada de oviposición poseen una tasa de supervivencia mayor que los individuos tardíos (Crespo 2007). Esto estaría relacionado con el desfase temporal que aparece entre los individuos nacidos tempranamente y el estadio del hospedador susceptible al parasitismo. En estudios previos se encontró que el primer estadio larval no posee la capacidad de orientarse hacia su hospedador ni de localizarlo, pero tendría la capacidad de detectarlo. De esta manera, la búsqueda activa del hospedador comienza luego que la larva de *M. ruficauda* muda al segundo estadio utilizando para ello sus propias reservas energéticas (Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2008). Esta característica es única entre los parasitoides. Existen, en la bibliografía, varios

ejemplos de parasitoides donde el encuentro con el hospedador se da luego de una búsqueda activa del primer estadio larval (Godfray 1994, Yeates y Greathead 1997, Feener y Brown 1997, Brodeur y Boivin 2004, Stireman et al. 2006).

Las larvas de *M. ruficauda* parasitan al estado larval de los coleópteros de la familia Scarabaeidae, conocidos como gusanos blancos del suelo (Remedi de Gavoto 1964, Dennis y Knutson 1988, Castelo 2003). Se han realizado estudios del parasitismo de *M. ruficauda* sobre las especies de gusanos blancos y se encontró que existe una marcada preferencia de parasitismo por larvas de tercer estadio de *Cyclocephala signaticollis* Burmeister en el campo, llegando a ser del 87% (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010). A pesar que este parasitoide tiene preferencia por una especie de hospedador, se han encontrado casos en los que otras especies de gusanos blancos fueron parasitados (i.e. *C. putrida* y *C. modesta*). Barrantes (2009) realizó estudios de orientación hacia diferentes especies de potenciales hospedadores (i.e. especies de gusanos blancos con bajo porcentaje de parasitismo a campo) y encontró indicios de que larvas en diferente estado fisiológico se orientaban a especies habitualmente poco seleccionadas. Es decir, que esta especie de parasitoide podría estar utilizando la información de las reservas energéticas de su propio cuerpo al momento de decidir orientarse hacia algún hospedador.

La orientación activa de las larvas de *M. ruficauda* hacia los hospedadores se da principalmente mediante claves químicas provenientes del intestino posterior del gusano (Castelo y Lazzari 2004). Groba y Castelo (enviado) han estudiado el origen corporal de la clave química atractiva para las larvas de *M. ruficauda* y encontraron que esta se encuentra presente en el rumen (cámara de fermentación) del intestino posterior de los gusanos blancos. Se desconocen, sin embargo, tanto el mecanismo de orientación hacia el hospedador como las estructuras involucradas en su detección.

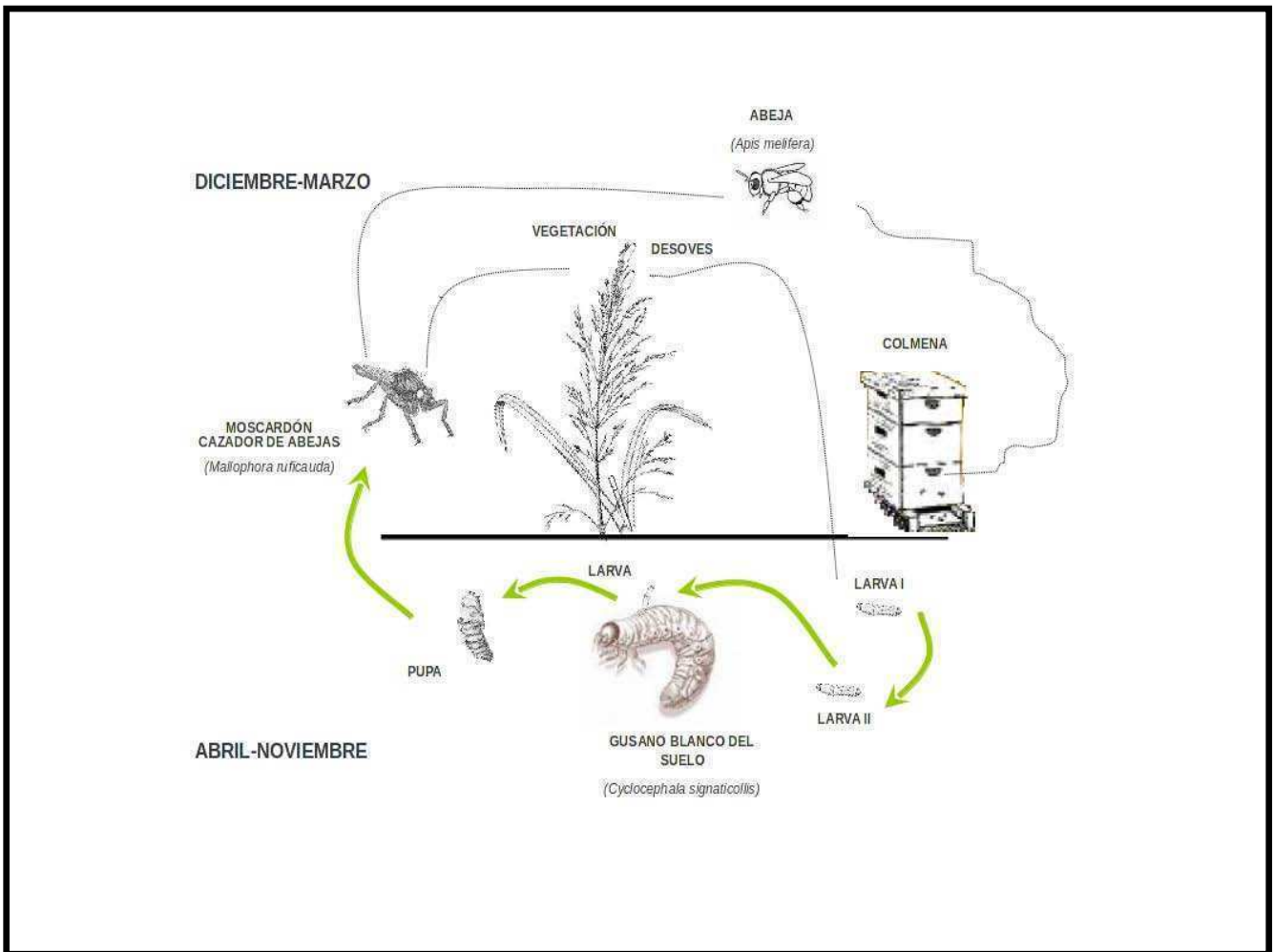


Figura1.2. Ciclo de vida de *M. ruficauda*.

Una vez que encuentra al hospedador, la larva se posiciona sobre su tegumento y se aferra a él, ayudada por las estructuras bucales (Musso 1981, Castelo 2003). La larva parasitoide se alimenta de la hemolinfa y tejidos de su hospedador durante el otoño y el invierno hasta el comienzo de la primavera pero se mantiene invariable en cuanto a su tamaño. Al finalizar el invierno, el hospedador sale del estado de letargo en que se encontraba y comienza la fase pre-pupa. En ese momento, la larva parasitoide comienza a desarrollarse rápidamente, consume totalmente a su hospedador y completa el resto de sus estadios, del tercero al quinto, hasta que empupa (Copello 1922, Castelo 2003). Se desconocen, sin embargo, la duración y supervivencia de estos estadios larvales. En verano la pupa se abre camino en la tierra y llega a la superficie del suelo, luego el adulto emerge y comienza a alimentarse de insectos.

Respecto a los adultos, son de hábito diurno y desarrollan todas sus actividades entre las 9 y 19 hs. La alimentación es máxima entre las 15-18 hs observándose una disminución entre las 11-14 hs, que se corresponde con un aumento de los comportamientos relacionados con la reproducción. La actividad de cortejo es máxima entre las 10-12 hs, las cópulas se producen mayoritariamente entre las 11-13 hs y la oviposición se produce entre las 10-17 hs con un pico entre las 11-13 hs (Nussenbaum 2007). Tricca y Trujillo-Cenóz (1980) realizaron observaciones y experimentos de campo para estudiar el comportamiento sexual en esta especie. La cópula se produce sobre un sustrato a los 30-40 minutos luego de iniciado el cortejo. Además, Tricca y Trujillo-Cenóz (1980) sugirieron que el patrón de color de las hembras, su tamaño y su posición sobre el soporte serían los responsables de dar inicio a las fases del cortejo en los machos. Estos resultados sugieren que los estímulos visuales jugarían un papel fundamental en el comportamiento sexual de *M. ruficauda*.

Biología de los hospedadores

Los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae) son larvas de escarabajos de régimen fitófago que cumplen la mayor parte de su ciclo de vida en el suelo (Figura 1.3b.). Estas larvas producen grandes daños en las raíces de las plantas por la acción de sus mandíbulas, motivo por el cual son consideradas una importante plaga de los cultivos comerciales y áreas verdes de recreación en diferentes partes del mundo (Ali y Harivandi 1987, Cherry y Schueneman 1998, Cranshaw y Zimmerman 1998, Crutchfield y Potter 1995, Potter 1998, Redmond y Potter 2010, Salvadori 1997, Smitley 1996). En la República Argentina, los cultivos más perjudicados son los cereales, plantas forrajeras (pasturas) y hortalizas (Remedi de Gavotto 1964, Alvarado et al. 1981, Alvarado 1983). Estas larvas son especialmente perjudiciales en los cultivares de papa del sudeste de la provincia de Buenos Aires, siendo una de las especies más dañinas *C. signaticollis* (Remedi de Gavotto 1964, Álvarez Castillo et al. 1993, Carmona et al. 1994, López et al. 1994; Figura 1.3.). Estos gusanos son hospedadores de las larvas de *M. ruficauda* (Crouzel 1965), en especial *C. signaticollis* (Remedi de Gavotto 1964, Dennis y Knutson 1988, Castelo y Capurro 2000, Castelo y Corley 2010). Se han detectado nueve especies de gusanos blancos en la provincia de Buenos Aires: *Anomala testaceipennis* Blanchard, *Archophileurus vervex* Burmeister, *Bothynus striatellus*

Fairmaire, *C. signaticollis*, *C. modesta* Burmeister, *C. putrida* Burmeister, *Diloboderus abderus* Sturm, *Heterogeniates bonariensis* Ohaus, *Philochloenia bonariensis* Bruch (Alvarado 1980).

Cyclocephala signaticollis posee un ciclo de vida de un año de duración con tres estadios larvarios. Los adultos emergen en los primeros días de diciembre y prontamente colocan sus huevos en forma aislada y en pequeños terrones en el suelo entre 0 y 10 centímetros de profundidad. El porcentaje de nacimientos (fertilidad) es del 93% para las puestas tempranas. El período de oviposición dura en promedio 15,8 días y la fecundidad máxima es de 7,1 huevos/hembra. El promedio de la duración en días de cada uno de los estadios es: desarrollo embrionario 22,5; primer estadio larval 40; segundo estadio larval 32; tercer estadio larval 217; pupa 20 y adulto 31, siendo las hembras más longevas que los machos (López et al. 1994). Según Carmona et al. (1994), *C. signaticollis* prefiere suelos blandos y removidos para oviponer. *Cyclocephala signaticollis* es nativa de la Argentina y el Uruguay. Esta especie se encuentra en la República Argentina en la provincia de Buenos Aires, este de Córdoba, sur de Santa Fe, provincia de Entre Ríos y nordeste de La Pampa.

Las larvas del tercer estadio se hallan entre 5 y 15 centímetros de profundidad en el suelo y pasan el invierno en el interior de una celda en la tierra como larva invernante. Son del tipo escarabeiforme, en forma de "C", con la cabeza quitinizada y el cuerpo blando y color blanco cremoso alcanzando un tamaño máximo de 25-30 milímetros de longitud. Las larvas se alimentan de raíces y semillas de trigo, maíz, cebada, lino, alfalfa, girasol y productos hortícolas tales como lechuga y zanahoria (Remedi de Gavotto 1964, Alvarado et al. 1981, Alvarado 1983). Producen grandes daños en los cultivos de papa (hasta un 60% de pérdida) en el sudeste bonaerense (Álvarez Castillo et al. 1993, Carmona et al. 1994, López et al. 1994) y en semillas de *Agropyron* sp. y *Melilotus* sp. (Alvarado 1983). Los gusanos blancos se convierten en una plaga de la agricultura cuando su densidad alcanza el nivel de daño económico de 4/m² (Alvarado 1979). En general su presencia se asocia a un suelo franco arcilloso (argiudol típico) de alta fertilidad. Entre las larvas de Scarabaeidae la mayoría de las especies se hallan en profundidades de entre 0 y 15 centímetros y la minoría llega hasta los 30 centímetros (Carmona et al. 1994). Posee un período de prepupa donde la larva pierde su forma típica escarabeiforme y no se alimenta (López et al. 1994).

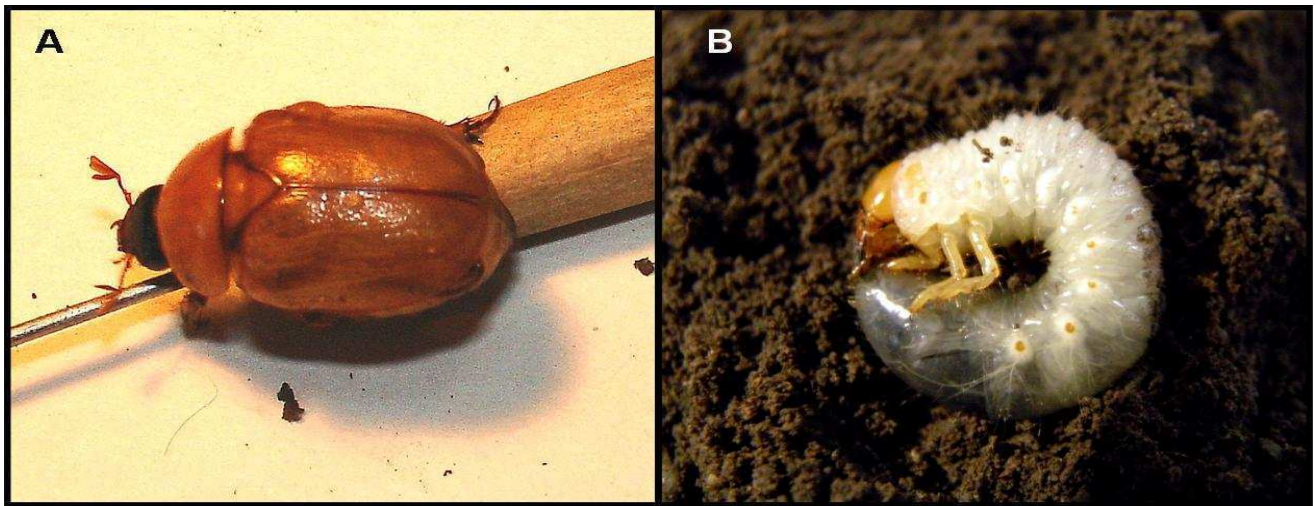


Figura 1.3. *Cyclocephala signaticollis*. a) Hembra. b) Larva de tercer estadio (gusano blanco). Fotografías: José E. Crespo.

Parasitismo de los hospedadores

En sucesivos muestreos de campo en diferentes localidades de la región pampeana, Castelo y Corley (2010) determinaron el grado de especificidad de *M. ruficauda* sobre las 9 especies de gusanos blancos presentes en su área de distribución. Las frecuencias de parasitismo observadas indican que *M. ruficauda* prefiere a *C. signaticollis* como hospedador, ya que la frecuencia relativa de ataques sobre esta especie es la mayor encontrada en el campo (86,6%). En otras especies de gusano blanco pertenecientes al mismo género, las frecuencias relativas de parasitismo son menores, siendo de 6,7% para *C. modesta* y 1,4% para *C. putrida*. Luego, para *P. bonariensis* se encontró un porcentaje de parasitismo de 3,4%. En el caso de *D. abderus*, *A. testaceipennis*, *A. vervex*, *H. bonariensis* y *B. striatellus*, los valores son muy bajos, siendo de 1%, 0,5%, 0,5%, 0% y 0%, respectivamente. Al estudiar la especificidad de hospedadores a microescala espacial, donde las larvas de *M. ruficauda* son las que eligen y aceptan a los hospedadores, se detectó que los individuos de *C. signaticollis* son preferentemente parasitados cuando se encuentran junto con individuos de otras especies hospedadores en la misma porción de suelo. En cambio, para el resto de las especies de gusanos blancos se encontró que la probabilidad de ser parasitado es significativamente más baja cuando *C. signaticollis* está presente. Estos datos muestran que *M. ruficauda* tendría cierta flexibilidad para utilizar distintos hospedadores y no sería estrictamente especialista, pero sin embargo prefiere a *C. signaticollis*. No obstante, dada la magnitud geográfica y temporal de este

trabajo, los datos de campo obtenidos fueron evaluados en forma global y no teniendo en cuenta la situación particular de cada sitio muestreado a escala local, en referencia a la abundancia relativa de las distintas especies de larvas de Scarabaeidae y al estado fisiológico de las larvas de *M. ruficauda* que se encontraron parasitando estos gusanos. Por lo tanto, aun queda pendiente conocer si las larvas parasitoides tienen la capacidad de orientarse hacia diferentes especies de gusano blanco en distintas situaciones de disponibilidad real de hospedadores, y si son capaces de aferrarse y establecer un ataque exitoso en distintos escenarios de estado fisiológico de los parasitoides.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Objetivo General

En este trabajo se estudiaron los comportamientos involucrados en la localización del hospedador en el parasitoide *M. ruficauda* y la influencia de factores internos y externos sobre las decisiones de búsqueda, detección, orientación, aceptación y uso del hospedador.

Preguntas particulares

- 1) ¿Existe un mecanismo de orientación hacia el hospedador? ¿Cuáles son los órganos sensoriales involucrados en la detección de los olores asociados al hospedador?
- Las larvas contarán con un mecanismo activo de búsqueda que asegurará el encuentro con el hospedador. Estructuras de la cápsula cefálica (i.e. antenas, palpos maxilares) serán las principales involucradas en la búsqueda y el encuentro con el hospedador.

- 2) ¿Las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar entre hospedadores sanos y monoparasitados por medio de claves químicas? ¿En qué condiciones las larvas de *M. ruficauda* aceptan el superparasitismo?

- Las larvas de *M. ruficauda* serán capaces de discriminar el grado de parasitismo de un hospedador por medio de claves químicas. El superparasitismo será aceptado en los casos donde la calidad del hospedador permita el desarrollo exitoso de cualquiera de las larvas parasitoides, es decir en aquellos que cuenten con mayor cantidad de reservas energéticas.
- 3) ¿La larva de *M. ruficauda* posee la capacidad de integrar información proveniente del ambiente (factores externos) y de su propio cuerpo (factores internos) y utilizarla como criterio en la orientación y aceptación del hospedador?
- Existirán tanto factores bióticos externos (densidad de coespecíficos, grado de parasitismo del hospedador, estadio del hospedador) como internos (edad de la larva) que tendrán influencia de manera diferencial en la orientación y aceptación del hospedador. Se espera que las larvas jóvenes elijan preferentemente hospedadores sanos y bien desarrollados cuando no exista competencia intraespecífica.
- 4) ¿Cómo influye el cambio en las condiciones ambientales en el proceso de búsqueda del hospedador en *M. ruficauda*?
- El advenimiento de condiciones ambientales desfavorables (i.e. una disminución en la presión atmosférica) tendrá influencia sobre el comportamiento de orientación hacia el hospedador. Se espera que la actividad de búsqueda se reduzca en presencia de malas condiciones ambientales.
- 5) ¿Cuál es la estrategia de uso del hospedador que poseen las larvas de *M. ruficauda* en cada estadio?
- El parasitoide tiene una estrategia de supervivencia durante el estado larval en la que alguno de los estadios larvales involucrados en la búsqueda del hospedador podrá sobrevivir hasta que el hospedador se encuentre disponible. Cada estadio larval del parasitoide hará un uso de los recursos del hospedador de manera diferencial en tiempo, donde alguno tendrá una estrategia de supervivencia que le permitirá extender la ventana de parasitismo.

De manera general, se estudió la influencia de factores externos e internos sobre las decisiones que toman las larvas de *M. ruficauda* y como estas decisiones pueden incrementar la probabilidad de que el parasitismo sea exitoso (Figura 1.4).

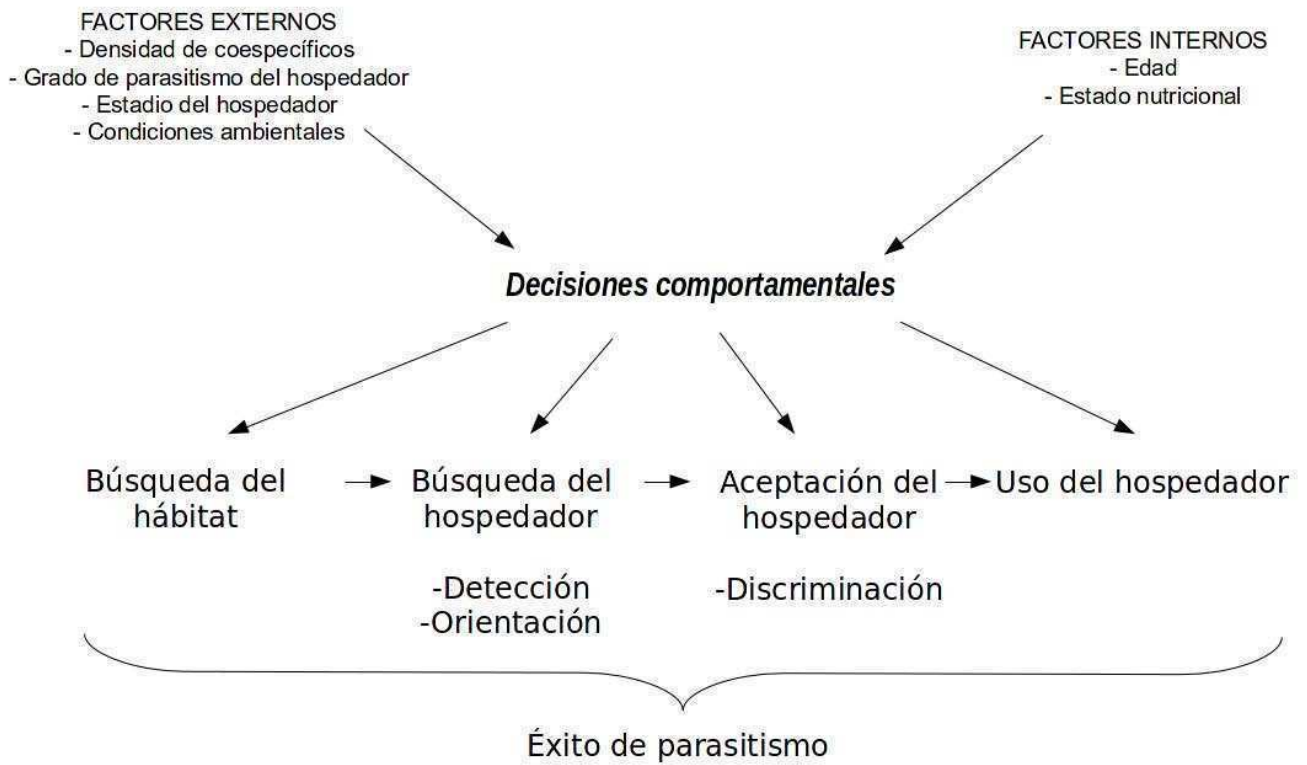


Figura 1.4. Esquema de los factores estudiados en esta Tesis que influyen en los comportamientos de la larva de *M. ruficauda* asociados al parasitismo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Recolección y mantenimiento de los insectos

Los desoves de *M. ruficauda* se colectaron directamente de la vegetación herbácea en pastizales asociados a campos de la Provincia de Buenos Aires, donde se practica la apicultura, ubicados en las localidades de Moreno (34° 46 S, 58° 93 W), Pilar (34° 28 S, 58° 55 W) y Mercedes (34° 65 S, 59° 43 W). La recolección de los huevos se realizó en los veranos desde el 2006 hasta el 2011. Para obtener los desoves, simplemente se cortó la rama seca o soporte y se los colocó individualizados en tubos de polietileno de 30 ml hasta el nacimiento de las larvas. Inmediatamente luego de la eclosión de los huevos, las larvas recién nacidas se separaron individualmente en tubos de 1,5 ml con un papel húmedo como sustrato. Cada vez que fue necesario, se agregaron gotas de agua con el fin de mantener un 100% de humedad dentro del tubo y evitar así la deshidratación de las larvas. Los tubos fueron mantenidos en oscuridad y a una temperatura de 25-28 °C hasta que las larvas parasitoides alcanzaron la edad y estadio específicos para los experimentos.

Por otra parte, los hospedadores, gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*, fueron recolectados como larvas de tercer estadio de muestras de suelo tomadas en las mismas localidades que los desoves. Los hospedadores fueron colectados durante el otoño de los años 2006 a 2010 en los pastizales cercanos a colmenas de abejas donde se había observado actividad de *M. ruficauda* en los veranos anteriores. Para recolectar a los hospedadores, se hicieron muestreos al azar realizando pozos en el suelo a una profundidad de 30 cm. Cada larva fue identificada a nivel de especie en el laboratorio con la ayuda de una clave taxonómica y se registró la cantidad de larvas parasitoides aferradas a la cutícula (Alvarado 1980). Una vez identificados, los gusanos blancos se mantuvieron a temperatura ambiente en tubos negros (3cm de radio, 5cm de altura) llenos con tierra, y fueron alimentados semanalmente con pedazos de zanahoria fresca.

Experimentos de olfatometría

A. Dispositivos experimentales y procedimientos

Para realizar los experimentos de olfatometría en esta Tesis, se utilizaron tres olfatómetros desarrollados por Castelo (2003). Los olfatómetros utilizados en esta Tesis se denominan de ambiente estacionario ya que no existe una corriente de aire en su interior que transporte los estímulos. Se ha visto que las larvas de *M. ruficauda* son muy sensibles a la desecación, dado que a partir de valores muy bajos de humedad relativa ambiente la mortalidad es muy elevada. Por otro lado, las larvas de este parasitoide viven durante todo su desarrollo dentro del suelo, donde no existen corrientes de aire. Es por estas razones que en esta Tesis se utilizaron olfatómetros donde no hay corriente de aire circulando y los estímulos son transportados por el gradiente que se forma en el aire durante el período de experimentación. El primero de los olfatómetros, denominado “gusanos-larvas”, consiste en una arena experimental de 15,5 x 4 x 4 cm que se divide en tres zonas equivalentes, dos laterales y una central. Cada zona lateral queda delimitada por una malla plástica dentro de la cual se coloca como fuente de estímulo a un hospedador vivo. La malla plástica permite el libre paso de las larvas parasitoides por toda la arena pero restringe el desplazamiento de los hospedadores fuera de su zona (Figura 2.1a.).

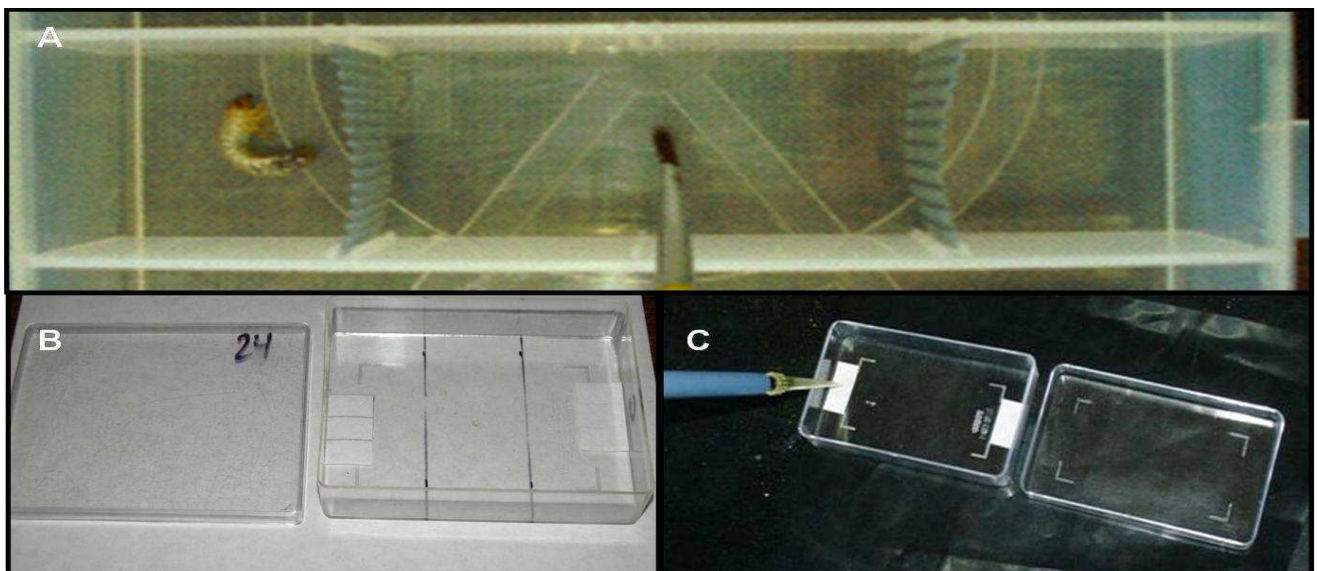


Figura 2.1. Dispositivos utilizados en los experimentos de olfatometría para la medición de las respuestas comportamentales. a) Olfatómetro “gusanos-larvas”. b) Olfatómetro “extractos-gusanos”. c) Olfatómetro “extractos-larvas”. Fotografías: José E. Crespo.

El segundo olfatómetro, denominado “extractos-larvas”, es similar al anterior salvo que sus dimensiones son diferentes. En este caso, la arena experimental es de 9 x 5 x 1,5 cm y no lleva ninguna clase de división para delimitar las zonas laterales, ya que se utilizan extractos o soluciones

del hospedador y no hospedadores vivos. Durante los ensayos, en cada zona lateral se coloca un papel de filtro de 2 x 1 cm impregnado con 10 μ l de la solución del hospedador (estímulo) o hexano (control). Se utiliza hexano como solución control ya que este es el solvente utilizado para la obtención de las soluciones (Castelo y Lazzari 2004; Figura 2.1c.).

Por último, el tercer olfatómetro, denominado “extractos-gusanos”, es similar al segundo salvo por sus dimensiones. En este caso, la arena experimental es de 13 x 8 x 2 cm y el sujeto experimental es una larva del hospedador *C. signaticollis*. Durante los ensayos se coloca un papel de filtro de 3 x 2 cm en cada extremo de la arena embebido en la solución estímulo o control (Figura 2.1b.).

En cada experimento, independientemente del olfatómetro utilizado, se liberó al sujeto experimental en el centro de la arena y, luego de 90 minutos, se registró su posición. De esta manera, se pudieron obtener tres respuestas posibles: elección por el estímulo (E), el control (C), o no decisión (ND) en el caso que la larva se encontrara en la zona media. Luego de cada experimento, cada individuo se descartó y la arena experimental se limpió con detergente no iónico y agua, y se repasó con alcohol 96° para eliminar cualquier remanente de la clave. Luego, se secó cada arena experimental con una corriente de aire para eliminar la humedad. Todos los experimentos fueron realizados entre las 10:00 y las 17:00 hs bajo condiciones de laboratorio ($26^{\circ} \pm 3.5^{\circ} \text{C}$, $50 \pm 20 \text{ HR}$), en días donde la presión barométrica ambiental se encontraba entre los 1008 y los 1015 mbar y en oscuridad ya que las larvas de ambas especies viven enterradas (Ver Introducción General). Con el fin de mantener la humedad relativa elevada en la arena experimental se colocó en la tapa un papel de filtro húmedo a saturación. Además, en todos los casos donde se utilizaron larvas parasitoides se realizó una serie control únicamente con el solvente hexano (C-C) para medir la tendencia de los insectos a iniciar movimientos exploratorios. Para esta serie se utilizó solamente el solvente de extracción como solución en ambos extremos de la arena experimental. Esto permitió comparar los movimientos larvales asociados con otros comportamientos además de los relacionados con la búsqueda del hospedador y también detectar cualquier defecto inherente al dispositivo experimental. También se realizaron experimentos control con la arena vacía para detectar posibles problemas de la arena cuando se realizaron experimentos con gusanos blancos como individuos experimentales.

B. Obtención de estímulos del hospedador

En los experimentos de olfatometría se utilizaron como estímulo gusanos blancos vivos de la especie *C. signaticollis* o de una solución proveniente de ellos, dependiendo del tipo de experimento. En el primer caso se utilizaron gusanos blancos sanos y mantenidos en el laboratorio en condiciones de no disturbio por al menos 48 hs. En el segundo caso, los estímulos de los hospedadores se obtuvieron a partir de extractos de los gusanos blancos. A cada larva del tercer estadio se la dispuso 30 minutos en un freezer para su adormecimiento y posterior manipulación. Una vez que los individuos fueron enfriados se les practicó un corte transversal en el abdomen a la altura del mesenterón, dividiendo al gusano blanco en dos mitades (Figura 2.2.). La parte anterior fue descartada y solo fue utilizada la porción posterior, debido a que es la fracción del cuerpo que contiene la sustancia atractiva para las larvas de *M. ruficauda* (Castelo 2003, Castelo y Lazzari 2004). Cada extracto de hospedador fue realizado utilizando la mitad posterior de 5-15 gusanos blancos, las cuales fueron colocadas en un mortero de vidrio donde fueron homogeneizadas utilizando hexano como solvente, debido a que la señal química atractiva para las larvas de *M. ruficauda* es de naturaleza no polar (Castelo y Lazzari 2004). Luego, el extracto fue evaporado utilizando un burbujeo con nitrógeno hasta obtener una concentración de 2,5 gusanos blancos/ml que es más del doble de la concentración utilizada por Castelo y Lazzari (2004) con la cual se observó una respuesta por parte de las larvas parasitoides. Esta concentración se utilizó en todos los experimentos de olfatometría realizados en esta Tesis con el fin de garantizar respuesta de la larva de *M. ruficauda*. Los extractos fueron mantenidos en el freezer a -12 °C para evitar su degradación, mantener su cualidades y para impedir la evaporación del solvente y el consecuente incremento de la concentración. Se utilizaron varios gusanos blancos por homogenato para contemplar la variabilidad de los individuos y diluir los posibles efectos dependientes del estado fisiológico de los insectos que puedan afectar a la clave química.

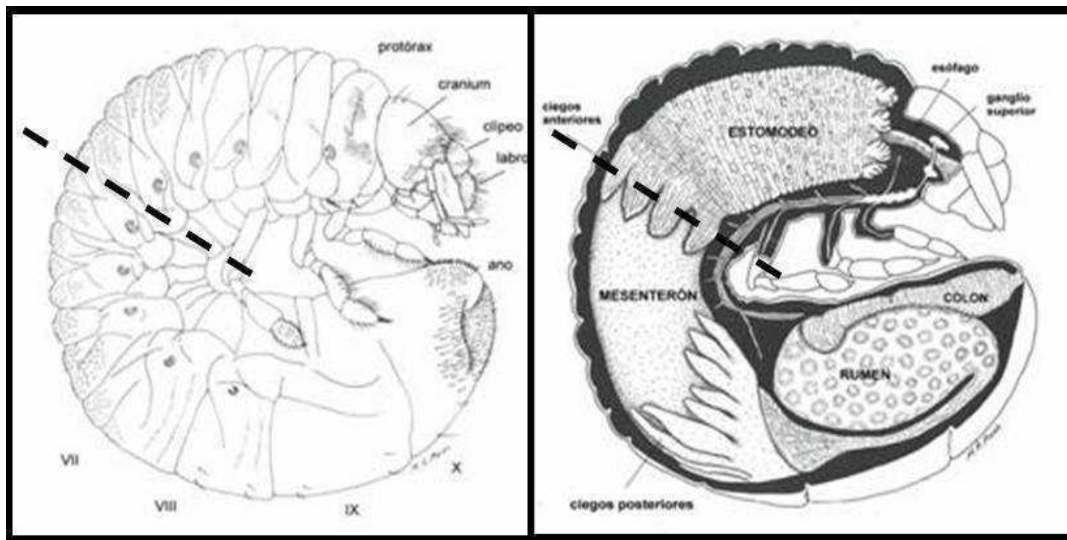


Figura 2.2. Esquema lateral de la larva de tercer estadio de *C. signaticollis*: a) Morfología externa general. (b) Anatomía interna del sistema digestivo. En línea punteada se muestra la localización del corte realizado para preparar los homogenatos de hospedador (parte posterior). Ilustración realizada por M.A. Morón, copiada con su autorización (Comunicación personal, 2007).

Experimentos de aferramiento al hospedador

Estos experimentos consisten básicamente en el parasitismo artificial de los hospedadores con larvas de *M. ruficauda* donde se cuantifica la respuesta de aceptación. Los detalles serán explicados en el Capítulo 4.

C. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos utilizados en esta Tesis se describen en detalle en cada Capítulo.

CAPÍTULO 3

MECANISMOS DE ORIENTACIÓN Y ÓRGANOS SENSORIALES INVOLUCRADOS EN LA LOCALIZACIÓN DEL HOSPEDADOR EN *Mallophora ruficauda*

Este Capítulo dio origen a la siguiente publicación: Crespo JE, Lazzari CR & Castelo MK, 2011. Orientation mechanisms and sensory organs involved in host location in a dipteran parasitoid larva. *Journal of Insect Physiology*, Vol. 57, 191-196.

Introducción

La búsqueda del hospedador es uno de los desafíos más importantes para los parasitoides. Existen muchos estudios donde se muestra que los parasitoides pueden utilizar kairomonas, compuestos químicos que se intercambian entre individuos de diferente especie cuya emisión solo beneficia al receptor, asociadas a los hospedadores en su localización (Monteith 1955, Mitchell y Mau 1971, Godfray 1994, Klowden 2007). Por otra parte, las estrategias que utilizan los parasitoides en esta tarea han sido muy estudiadas para los himenópteros, pero para los dípteros existe mucha menos información (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Vet et al. 2002, Brodeur y Boivin 2004). Los dípteros parasitoides tienen estrategias de búsqueda en las cuales están involucrados el estado adulto y alguno de los estadios larvales.

Respecto del estado larval, se han descrito tres estrategias mediante las cuales los individuos pueden contactar a los hospedadores: a) el huevo del parasitoide puede ser ingerido durante la alimentación del hospedador, b) la larva parasitoide puede esperar a que un hospedador pase cerca y atacarlo, o c) la larva parasitoide puede realizar una búsqueda activa del hospedador (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Vet et al. 2002). Estos tipos de estrategias son comunes en algunas familias del orden Diptera como son Tachinidae, Bombyliidae y Calliphoridae. Sin embargo, muy poca información existe sobre las claves específicas y los mecanismos de orientación que usan las larvas que realizan la búsqueda activa del hospedador. Particularmente los parasitoides de la familia Asilidae han sido muy poco estudiados. En cuanto a las larvas que realizan una búsqueda activa del hospedador, se han estudiado las claves involucradas y es común que la orientación se realice por medio de claves químicas. Particularmente, la quimiorrecepción es importante en la orientación de insectos que viven privados de luz, como las especies nocturnas o que viven bajo tierra (Gullan y Cranston 2005, Klowden 2007).

Las claves químicas desencadenan comportamientos de orientación, es decir, mecanismos que guían a un individuo hacia la fuente de un estímulo. Este mecanismo puede ser caracterizado de acuerdo a la respuesta que el estímulo provoca en el receptor (Wyatt 2003). Se han descrito

principalmente dos mecanismos de orientación, i.e. las kinesis y las taxias. Las kinesis son mecanismos de orientación basados en la modulación de la actividad por la intensidad del estímulo independientemente de su direccionalidad. A su vez, las kinesis pueden involucrar la modulación de la velocidad (ortokinesis) o la tendencia de giro (kinoquinesis) de un individuo en respuesta a los cambios de intensidad de un estímulo. Las taxias, por otro lado, son mecanismos de orientación basados en la direccionalidad del estímulo (Dusenbery 1992, Kennedy 1977, Wyatt 2003). De acuerdo a como el sistema sensorial del receptor determina la direccionalidad del estímulo, se han propuesto tres tipos de taxias diferentes. La tropotaxis se da cuando hay una comparación simultánea bilateral, mientras que la telotaxis está definida cuando existe una resolución espacial unilateral. Por último, la klinotaxis se da por comparaciones múltiples del estímulo (Klowden 2007).

A su vez, un mecanismo de orientación se relaciona con las particularidades tanto del tipo de señal (independientemente de si provee información direccional), como de la organización del sistema sensorial en cuanto a la detección de la clave (independientemente de si provee información espacial; Lazzari 2009). De esta manera, la elucidación de los mecanismos de orientación involucrados en una respuesta particular puede proveer de información valiosa sobre la manera en que el sistema sensorial está operando y sobre como un determinado animal utiliza la información relevante.

La búsqueda del hospedador en *M. ruficauda* involucra tanto la fase adulta como la larval (ver detalle en la Introducción General). Las hembras localizan a sus hospedadores a una escala grande y oviponen en soportes de altura elevada en los pastizales. Las larvas, por otro lado, deben luego localizar y parasitar al hospedador por sus propios medios bajo tierra. Crespo y Castelo (2008) estudiaron los estadios larvales involucrados en la localización del hospedador y encontraron que esto ocurre solamente cuando el parasitoide muda al segundo estadio. Además, se encontró que existen claves químicas liberadas desde el intestino posterior del hospedador que son utilizadas por las larvas de *M. ruficauda* en la búsqueda (Castelo y Lazzari 2004, Crespo y Castelo 2008, Groba y Castelo, enviado). Sin embargo, aún se desconoce la identidad de esta clave atractiva. Por otro lado, también se desconocen los mecanismos de orientación de la larva parasitoide así como los

principales órganos sensoriales involucrados en la localización del hospedador. Por lo tanto, en este capítulo se estudiaron: 1) La identidad de los órganos sensoriales responsables de la detección de químicos asociados a los hospedadores, y 2) El mecanismo de orientación hacia el hospedador, ambos en la larva de segundo estadio de *M. ruficauda*.

Materiales y Métodos

Insectos

En este capítulo de la Tesis se realizaron experimentos de olfatometría. Se utilizaron como individuos experimentales a larvas de estadio I y II de *M. ruficauda* provenientes de desoves recolectados a campo y que fueron mantenidas en el laboratorio luego de su nacimiento. Como estímulo del hospedador se utilizaron extractos de gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*. Los detalles metodológicos de los experimentos y la forma de obtención de los insectos se detallan en el Capítulo 2.

Las estructuras sensoriales y el mecanismo de orientación

Con el fin de determinar los órganos sensoriales que pudieran estar involucrados en la localización del hospedador, se realizaron preparados de larvas de primer y segundo estadio que fueron examinadas bajo un microscopio óptico estándar. Por otra parte, con el fin de determinar el mecanismo de orientación y establecer la importancia relativa de las claves químicas, se realizaron dos tipos de pruebas de elección dual en olfatómetros de ambiente estacionario. En el primer grupo de experimentos se ofrecieron hospedadores vivos a las larvas parasitoides utilizando el olfatómetro “gusanos-larvas” descrito en el Capítulo 2. Luego, en el segundo grupo de experimentos, se les ofrecieron extractos de hospedador a las larvas parasitoides en el olfatómetro “extractos-larvas”.

Para ambos grupos de experimentos se realizaron dos series experimentales y tres control. Para las series experimentales, se usaron larvas que habían sido sometidas a una ablación quirúrgica de los posibles órganos sensoriales, es decir, con uno o ambos palpos maxilares ablacionados (Tabla

3.1.). La ablación fue realizada utilizando un bisturí y bajo una lupa estereoscópica (40x), luego de anestesiarse a los animales durante 30'' sobre un pack refrigerante. Por otra parte, para determinar la orientación normal hacia el hospedador, se utilizaron larvas intactas a las que se les ofreció una solución estímulo de *C. signaticollis* en una serie control. La otra serie control se realizó con el fin de evaluar el efecto de la manipulación sobre las respuestas comportamentales de las larvas. De esta manera, se realizó una serie sham donde se utilizaron larvas a las cuales se le realizó la ablación de dos de los ocho pelos caudales (Tabla 3.1.).

Análisis Estadístico

Para analizar el comportamiento de orientación de *M. ruficauda*, se evaluó la preferencia de las larvas parasitoides por cualquiera de las zonas laterales de la arena experimental, es decir por la zona E o C. Esta preferencia se analizó por medio de una Prueba de Bondad de Ajuste de Chi-cuadrado (Zar 1996). Por otra parte, se analizó la motivación de las larvas para iniciar el comportamiento de localización del hospedador como la proporción de individuos que se encontraron en la zona central de la arena, es decir la zona ND, por medio de un Análisis de Comparación Múltiple tipo Tukey (Zar 1996). Finalmente, con el fin de determinar si la ablación de los palpos maxilares afectó la actividad locomotora de las larvas, se realizaron comparaciones pareadas normalizadas de las larvas activas (que se encontraron tanto en la zona E como la C) entre las series experimentales y las control. Esta comparación se hizo tanto para el tratamiento de hospedadores vivos como de extracto de hospedador.

Resultados

Las estructuras sensoriales y el mecanismo de orientación

Se encontró que las larvas de primer y segundo estadio tienen un grado de desarrollo diferente de las estructuras de la cápsula cefálica. Las larvas de primer estadio poseen una cápsula

cefálica débilmente esclerotizada donde las estructuras que portan los órganos sensoriales (antenas y palpos) y las mandíbulas son pequeñas. En contraposición, la cápsula cefálica de la larva de segundo estadio está bien esclerotizada y posee palpos maxilares bilaterales totalmente desarrollados, mandíbulas y pelos conspicuos (Figura 3.1.). Los palpos maxilares tienen forma clavada y poseen sensilias en su superficie.

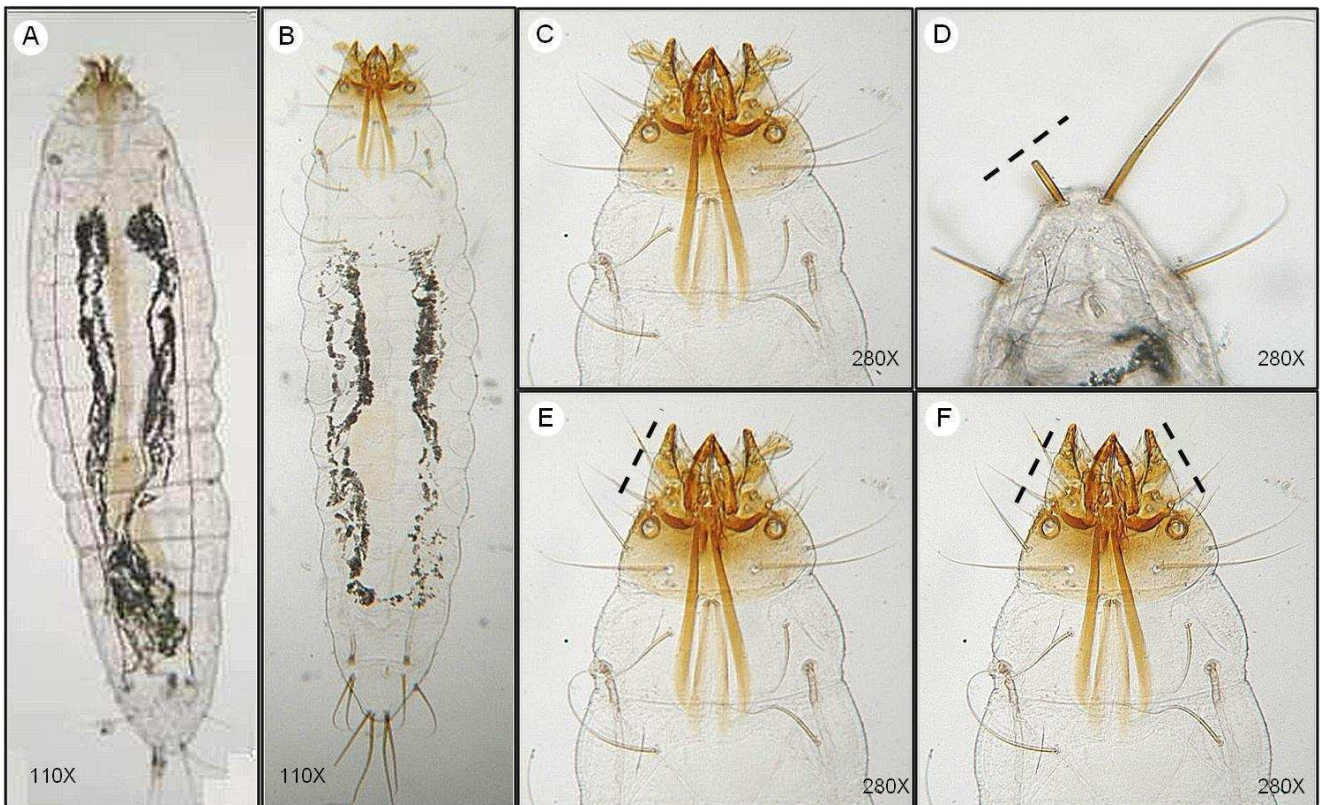


Figura 3.1. Fotografías de microscopio óptico de larvas de diferentes estadios de *M. ruficauda*: a) Larva de primer estadio. b) Larva de segundo estadio. c) Cabeza del segundo estadio larval donde se observa la esclerotización de la cápsula cefálica y ambos palpos maxilares. d) Vista posterior de la larva de segundo estadio donde se observan los pelos caudales cortados (control sham). e) Cabeza de la larva de segundo estadio donde se observa la ablación de un palpo maxilar (ablación unilateral). f) Cabeza de la larva de segundo estadio donde se observa la ablación de ambos palpos maxilares (ablación bilateral). c), e) y f) Detalle de las sensilias del cuerpo con mecanorreceptores. Fotografías: José E. Crespo.

En cuanto a los experimentos de orientación con hospedadores vivos, se encontró una alta proporción de larvas parasitoides de los grupos experimentales intactas, sham y con un solo palpo maxilar, en la zona de la arena donde se encontraba el estímulo (Tabla 3.1., Figura 3.2.). Por otra parte, las larvas sin ninguno de los palpos maxilares se distribuyeron al azar en la arena experimental (Tabla 3.1., Figura 3.2.). Resultados similares fueron obtenidos para los experimentos con extractos de hospedador (Tabla 3.1., Figura 3.3.).

Tabla 3.1. Diseño experimental utilizado para evaluar el mecanismo de orientación de las larvas de *M. ruficauda* hacia los hospedadores. Los números indican la cantidad de individuos utilizados. χ^2 : Valores de las pruebas de bondad de ajuste Chi-cuadrado.

Tratamiento	Estímulo	N	χ^2 ; P
Control (larvas intactas)	Hospedador vivo	36	13,444; < 0,001
	Extracto de hospedador	93	4,742; < 0,050
Control Sham (pelos caudales cortados)	Hospedador vivo	32	6,125; < 0,025
	Extracto de hospedador	87	6,080; < 0,025
Ablación unilateral (sin un palpo maxilar)	Hospedador vivo	38	5,158; < 0,025
	Extracto de hospedador	85	4,247; < 0,050
Ablación bilateral (sin ambos palpos maxilares)	Hospedador vivo	28	0,000; > 0,999
	Extracto de hospedador	50	0,080; > 0,750

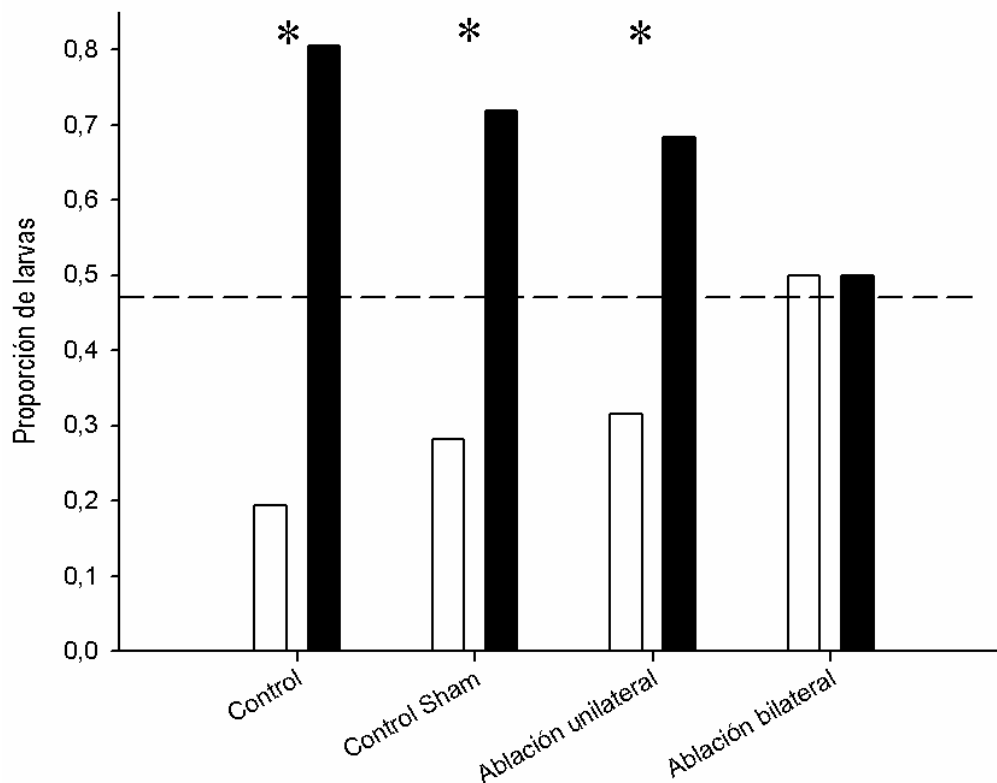


Figura 3.2. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* a los hospedadores vivos. Proporción de larvas que se encontró en la zona del control (barras blancas) o el estímulo (barras negras) de la arena experimental luego de 90 min de experimentación. Control: Larvas intactas, con ambos palpos maxilares funcionales. Control Sham: Larvas con dos pelos caudales cortados. Ablación unilateral: Larvas sin un palpo maxilar. Ablación bilateral: Larvas sin ambos palpos maxilares. En todos los tratamientos, el estímulo utilizado fue un individuo de *C. signaticollis*. *: Diferencias estadísticas significativas (χ^2 , $P < 0,01$).

Al analizar la motivación para iniciar movimientos de locomoción, es decir larvas que se encontraban fuera de la zona ND, se encontraron resultados diferentes en función de los distintos tratamientos aplicados. Para el caso donde el estímulo era el hospedador vivo, la motivación para iniciar movimientos fue similar en todos los tratamientos. Este resultado indicaría que la ablación de los palpos maxilares no afecta este comportamiento (Figura 3.4.). Para los experimentos con extractos del hospedador se obtuvieron resultados similares, excepto para el tratamiento donde ambos palpos maxilares se ablacionaron, que se encontró una mayor proporción de larvas en la zona ND que para el resto de las series (Figura 3.4.). La comparación normalizada pareada de los tratamientos experimentales entre las series mostró una diferencia significativa en la actividad. Las larvas eran más propensas a elegir alguna de las zonas laterales (C o E) cuando eran expuestas a hospedadores vivos y menos motivadas cuando se les ofrecían extractos del hospedador ($t=-3,2863$, $P < 0,020$).

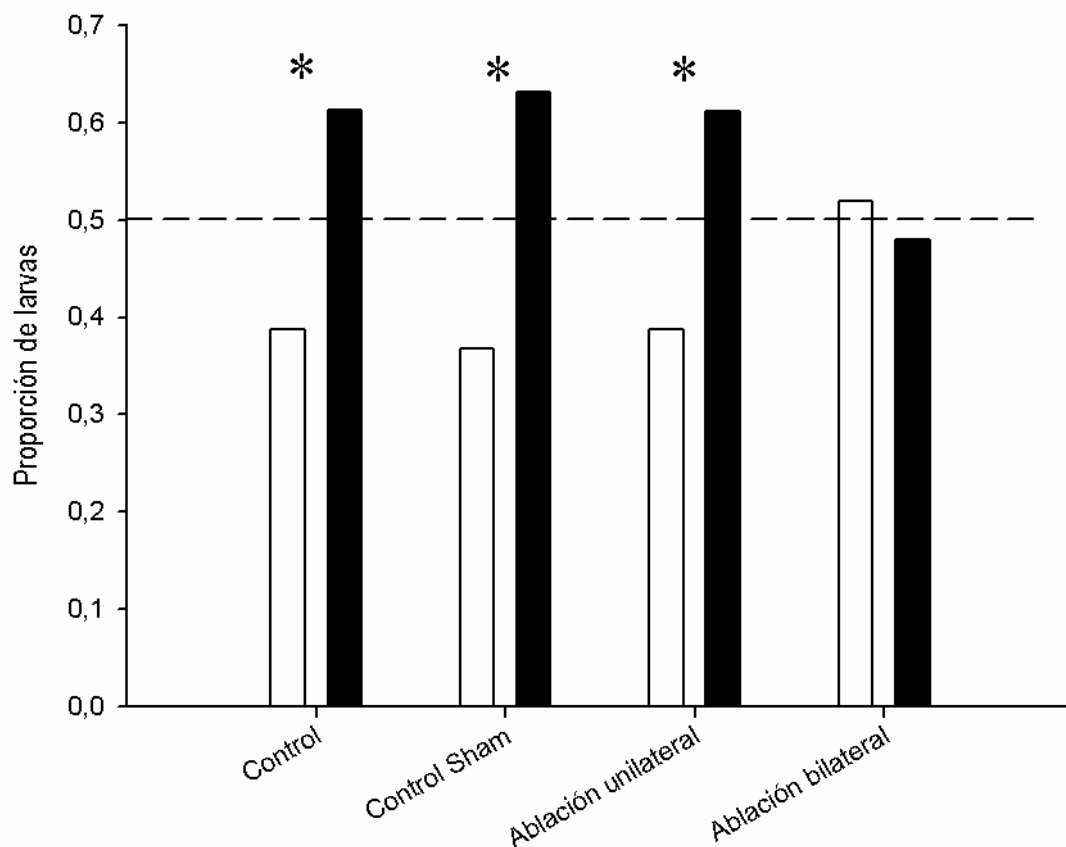


Figura 3.3. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* a extractos de hospedadores. Proporción de larvas que se encontró en la zona del control (barras blancas) o del estímulo (barras negras) de la arena experimental luego de 90 min de experimentación. Control: Larvas intactas, con ambos palpos maxilares funcionales. Control Sham: Larvas con dos pelos caudales cortados. Ablación unilateral: Larvas con un solo palpo maxilar. Ablación bilateral: Larvas sin ambos palpos maxilares. En todos los tratamientos, el estímulo utilizado fue una solución con olores de *C. signaticollis*. *: Diferencias estadísticas significativas (χ^2 , $P < 0,01$).

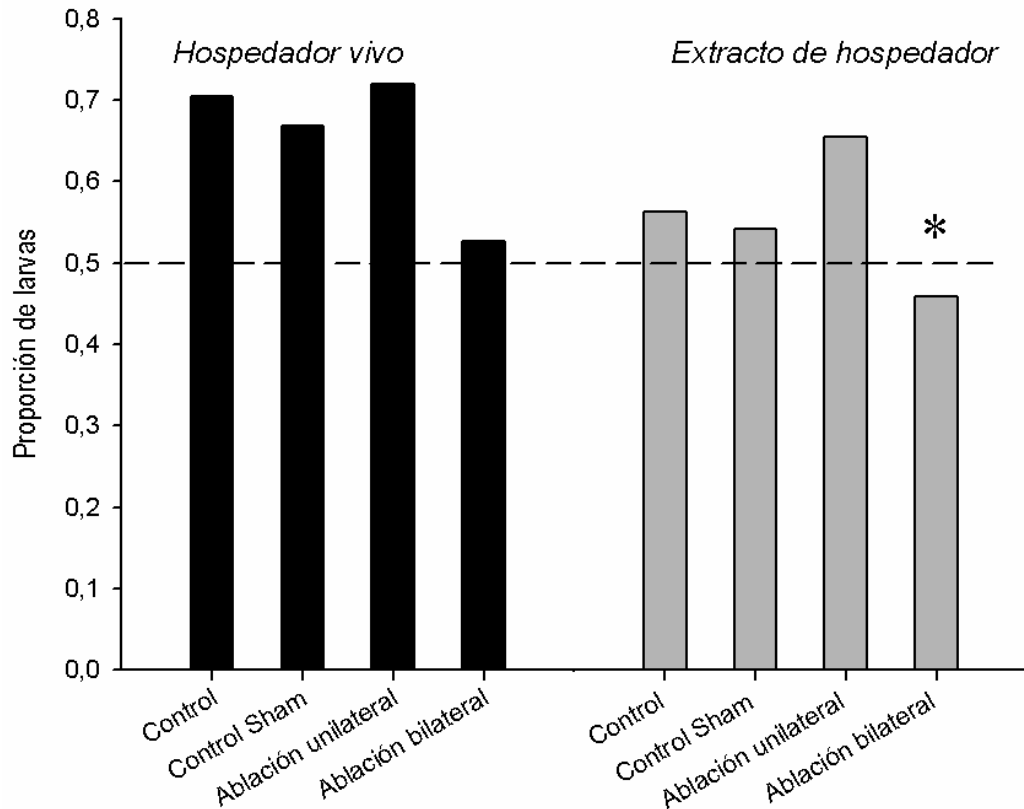


Figura 3.4. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* hacia los hospedadores vivos y extractos. Se muestra la proporción de larvas que abandonaron la zona de liberación (ND) cuando fueron expuestas a hospedadores vivos (barras negras) o a extracto de hospedador (barras grises). Control: Larvas intactas, con ambos palpos maxilares funcionales. Control Sham: Larvas con dos pelos caudales cortados. Ablación unilateral: Larvas con un solo palpo maxilar. Ablación bilateral: Larvas sin ambos palpos maxilares. *: Diferencias estadísticas intra-tratamiento (χ^2 , $P < 0,05$).

Discusión

En este capítulo se estudió cuáles son los órganos sensoriales de las larvas de *M. ruficauda* que están involucrados en la localización del hospedador. Se encontró que las larvas de segundo estadio poseen estructuras sensoriales más desarrolladas que las larvas de primer estadio. Los resultados obtenidos indican que *M. ruficauda* se orienta hacia su hospedador detectando olores con sensilias localizadas en los palpos maxilares y que la actividad de locomoción no es afectada por la ablación tanto uni- como bilateral de los palpos.

Un estudio previo muestra que las larvas de primer estadio tienen la capacidad de detectar la presencia del hospedador pero son incapaces de orientarse (Crespo y Castelo 2008). En este trabajo se muestra que tanto la cápsula cefálica como las estructuras sensoriales de las larvas de primer

estadio (antenas y palpos maxilares) están mucho menos desarrollados y esclerotizados que las larvas de segundo estadio. Respecto del mecanismo de orientación, se encontró que las larvas de segundo estadio son capaces de detectar y orientarse a su hospedador aun cuando solamente un palpo maxilar es funcional, lo cual indica que la orientación se da por medio de una taxia en vez de una kinesis. Esto se debe a que si una kinesis fuese el mecanismo involucrado, se esperaría una diferencia en la orientación debido a que habría menos órganos sensoriales involucrados. Existen dos tipos de taxias que dependen de estímulos sensoriales bilaterales independientes (con un solo órgano bilateral provee suficiente información para la orientación): tropotaxis y klinotaxis. Por un lado, la tropotaxis requiere que los órganos sensoriales sean capaces de proveer información espacial (por ejemplo, los ojos), lo que no parece ser el caso de los palpos maxilares en *M. ruficauda*. Por lo tanto, es probable que la larva de *M. ruficauda* se oriente por medio de klinotaxis por medio de comparaciones sucesivas de la concentración del estímulo durante el movimiento del insecto. Esto también puede explicar por qué aun las larvas ablacionadas unilateralmente se orientan hacia su hospedador.

Respecto de la motivación para iniciar la locomoción, se encontró que era mayor en las larvas expuestas a un hospedador vivo en vez de a extracto de hospedador. En presencia de un hospedador vivo, las larvas sometidas a todos los tratamientos mostraron similar motivación a iniciar movimientos exploratorios. Este resultado sugiere que existen claves, aparte de las químicas, provenientes de hospedadores vivos que inducen la actividad, pero estos no serían percibidos por los palpos maxilares. Existen otras claves, como por ejemplo vibraciones transmitidas por el sustrato, que son generadas por los movimientos del hospedador y pueden proveer información inespecífica relacionadas con la presencia del hospedador. Estas claves son comúnmente detectadas por mecanorreceptores que se encuentran en la cápsula cefálica de la larva parasitoide. Se sabe que este tipo de claves proporciona información utilizada en la orientación de varias especies de avispas parasitoides a sus respectivos hospedadores pero aun no existe un estudio donde se haya mostrado definitivamente la existencia de la vibrotaxis (Meyhöfer y Casas 1999).

Por otra parte, las antenas de las larvas poseen estructuras cubiertas por sensilias que tendrían la capacidad de detectar estímulos diferentes (Ryan 2002). Musso (1981) realizó un trabajo donde describe a las antenas de las larvas de las especies de la familia Asilidae como estructuras

redondeadas y globosas. Además, las antenas conservan la misma morfología aun luego de mudar al segundo estadio. Este resultado podría indicar que las setas sensoriales que se encuentran en las antenas son mecanorreceptores que no estarían relacionados con la orientación al hospedador mediada por claves químicas.

Se han realizado muchos estudios donde se registraron sensilias distribuidas a lo largo del cuerpo. Para el caso de las larvas, las mandíbulas, maxilas y las antenas son las zonas del cuerpo más comunes donde se encuentran sensilias (Zacharuk y Shields 1991). Por ejemplo, en las larvas de la oruga *Malacosoma americanum* Fabricius (Lepidoptera: Lasiocampidae), las sensilias antenales olfativas están involucradas en la aceptación de alimento (Dethier 1980). Los palpos maxilares también son conocidos mediadores en la orientación hacia diferentes estímulos. Es muy común que los insectos posean sensilias en los palpos maxilares, los cuales son frecuentemente utilizados en la detección o evaluación de alimento (Keil 1999). En el caso del gusano alambre *Agriotes obscurus* L. y *Limonius californicus* Mannerheim (Coleoptera: Elateridae) la orientación hacia el CO₂ se da por medio de sensilias localizadas en los palpos maxilares (Doane y Klingeer 1978). En *Manduca sexta* L. (Lepidoptera: Sphingidae) los palpos maxilares están involucrados en la aceptación de alimento así como también median la preferencia entre dos especies de plantas comúnmente rechazadas (de Boer 2006). Por otra parte, se ha encontrado que los palpos maxilares están involucrados en la quimiorrecepción de contacto de feromonas en las orugas de los géneros *Malacosoma* e *Yponomeuta* (Roessingh et al. 1988). El comportamiento quimiotáctico y los mecanismos genéticos subyacentes han sido estudiados en larvas de *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) (Louis et al. 2008). Estos autores encontraron que hasta una neurona funcional simple provee suficiente información permitiendo a la larva orientarse.

La detección de olores es de suma importancia en la localización de hospedadores en los parasitoides. En este contexto, un sistema de detección ajustado provee una gran ventaja al animal que se encuentra realizando una búsqueda. Los hospedadores son, generalmente, organismos pequeños que habitan en un ambiente natural complejo. Además, los hospedadores sufren de una fuerte fuerza de selección impulsándolos a ser inconspicuos para sus enemigos. Algunos parasitoides son capaces de utilizar el sistema de comunicación de su hospedador (como feromonas sexuales o de

agregación) y de esta manera encontrarlos. Sin embargo, algunos parasitoides deben utilizar claves indirectas de sus hospedadores. Por ejemplo, las larvas de *A. bilineata* son atraídas hacia el alimento del hospedador así como al complejo formado por el hospedador-planta en lugar de a los olores del hospedador mismo (Royer y Boivin 1999). En el caso de *M. ruficauda*, el individuo adulto no establece contacto directo con el hospedador nunca ya que la mosca vive en la parte aérea del pastizal y el hospedador vive debajo de la superficie del suelo. Se ha visto que el hospedador *C. signaticollis* también es atraído a los mismos estímulos que el parasitoide (Groba y Castelo, enviado, Castelo 2003). Este resultado indica que las larvas de *M. ruficauda* utilizarían la feromona de agregación de su hospedador al orientarse. Es de notar que ni la hembra ni la larva pueden utilizar claves visuales durante la búsqueda del hospedador ya que este vive enterrado y esto explicaría por que es tan importante que la larva parasitoide realice muestreos sucesivos del sustrato.

CAPÍTULO 4

DISCRIMINACIÓN Y ACEPTACIÓN DEL HOSPEDADOR EN *Mallophora ruficauda*

Este Capítulo dio origen a la siguiente publicación: Crespo JE & Castelo MK, 2010. Insights to host discrimination and host acceptance behaviour in a parasitoid (Diptera: Asilidae): Implications for fitness. *Journal of Insect Physiology*, Vol. 55, 1072-1078.

Introducción

Muchos de los estudios sobre la búsqueda del hábitat y del hospedador fueron situados bajo el paradigma de los modelos clásicos de parche-tiempo y han logrado predecir datos cualitativamente (Godfray 1989, Wajnberg et al. 2008). Por otra parte, la aceptación del hospedador ha sido mayormente estudiada bajo modelos de dieta (van Alphen y Vet 1986, Godfray 1994, Wajnberg et al. 2008). Generalmente, la aceptación del hospedador trata sobre la decisión del parasitoide hembra sobre qué hacer con un hospedador cuando lo encuentra, aceptarlo para oviponer, para alimentarse o rechazarlo. Esta decisión depende frecuentemente de factores externos (como la disponibilidad y calidad de hospedadores) e internos (como la carga de huevos, tiempo de supervivencia o el estado nutricional; Vet et al. 2002, Bernstein y Jervis 2008). La calidad del hospedador es un factor importante dado que puede determinar en gran medida el éxito de la descendencia del parasitoide (Brodeur y Boivin 2004, Wajnberg et al. 2008). Hay varios aspectos del hospedador como la edad, tamaño o estadio que le permiten al parasitoide calificarlo (Vet et al. 2002). Por otra parte, si el hospedador ha sido parasitado previamente también es un factor indicativo de la calidad del hospedador (Vet et al. 2002).

La discriminación del hospedador ha sido definida como la habilidad de los parasitoides para distinguir hospedadores sanos de parasitados (Roitberg y Mangel 1988). Dado que los hospedadores parasitados poseen un valor de fitness menor que los hospedadores sanos, se ha propuesto que la discriminación ha de estar bajo presión de selección debido a que las hembras capaces de discriminar a los hospedadores pueden evitar desperdiciar huevos y tiempo, y tener mayor ganancia en fitness (Godfray 1994, van Baaren et al. 1995, Royer et al. 1999). La discriminación inter e intraespecífica han sido descritas como las dos modalidades en que la discriminación del hospedador ocurre (Mackauer 1990). Por un lado, la discriminación intraespecífica se refiere a la capacidad de reconocer coespecíficos parasitando a un hospedador y ha sido descrita principalmente para los himenópteros (van Lenteren 1981, Mackauer 1990, van Alphen y Visser 1990, Brodeur y Boivin 2004) y en menor medida para los dípteros (Feener y Brown 1997, Brodeur y Boivin 2004). Por otro lado, la discriminación interespecífica es la capacidad que algunos parasitoides poseen para reconocer hospedadores parasitados por otras especies de parasitoides. Este comportamiento ha sido

descrito principalmente entre los himenópteros (Mackauer 1990, van Baaren et al. 1994). Es más, la discriminación del hospedador ha sido estudiada mayormente en parasitoides donde la hembra busca activamente a su hospedador. Sin embargo, hay algunos estudios que muestran discriminación del hospedador en parasitoides donde es la larva de primer estadio la que realiza la búsqueda (Royer et al. 1999, Brodeur y Boivin 2004). En estos parasitoides, dos especies de coleópteros del género *Aleochara*, la discriminación se basa principalmente en la detección de claves químicas y parcialmente en claves físicas relacionadas con el hueco de entrada en el pupario (Royer et al. 1999, Brodeur y Boivin 2004). Adicionalmente, se ha visto que las larvas de *A. bilineata* son capaces de evitar el superparasitismo cuando un hermano se encuentra parasitando a un hospedador pero también de primos relacionados a través de la línea paterna pero no de la materna (Lizé et al. 2006, Lizé et al. 2007).

Se ha asumido que la discriminación del hospedador en larvas con búsqueda activa del hospedador puede no ser tan ventajosa como en especies donde la hembra realiza la búsqueda, dado que las larvas poseen una frecuencia de encuentro con el hospedador menor debido a su limitada capacidad de dispersión en el ambiente (Feener y Brown 1997). Sin embargo, cuando el hospedador tiene una distribución agregada, la discriminación del hospedador en larvas con búsqueda activa podría ser ventajosa dado que estas podrían encontrar más de un hospedador en su vida (Brodeur y Boivin 2004, Feener y Brown 1997, Vet et al. 2002).

A pesar que la discriminación ayuda a los parasitoides a parasitar a un hospedador exitosamente, el superparasitismo puede ocurrir en algunas especies donde el parasitoide inmaduro debe competir con coespecíficos por los recursos (Godfray 1994, Brodeur y Boivin 2004). Se ha propuesto que el superparasitismo puede ser una estrategia ventajosa en algunos casos como en hembras denominadas time-limited (es decir, cuando la hembra posee una carga de huevos mayor que oportunidades de oviposición) o cuando la probabilidad de supervivencia al parasitar a un hospedador superparasitado es lo suficientemente alta (Godfray 1994, Vet et al. 2002). En este contexto, la mayor ganancia de fitness se daría al parasitar a un hospedador sano de alta calidad dado que proveería la mayor cantidad de energía. Por lo tanto, mecanismos como la discriminación del hospedador que aseguren el parasitismo exitoso del mejor hospedador disponible pueden maximizar

el fitness. También, estrategias comportamentales que ayuden a evitar la competencia previa o posterior al parasitismo podrían ser ventajosas.

En el caso de *M. ruficauda*, se desconoce si las larvas son capaces de discriminar a sus hospedadores en cuanto al grado de parasitismo. Se ha visto que las larvas de primer estadio son capaces de detectar la presencia del hospedador pero no son capaces de orientarse (Crespo y Castelo 2008). Por otra parte, la distribución espacial del hospedador es un factor que puede afectar las estrategias de localización, debido a que el patrón de distribución de los individuos influye directamente sobre la probabilidad de encontrar un hospedador en ese hábitat. En trabajos previos se han estudiado los patrones de distribución de las larvas de *C. signaticollis* en el suelo de los pastizales, encontrándose que tienen un patrón de distribución agregado (Castelo y Capurro 2000, Castelo 2003). En este escenario, la larva que colonice un parche de hospedadores va a tener la oportunidad de seleccionar a un individuo del grupo. Dado que *M. ruficauda* es un parasitoide solitario que tiene una alta especificidad por un estadio larval del hospedador determinado, la larva que realiza la búsqueda y que llega a un parche debería poder parasitar al hospedador que incrementa en mayor medida su fitness. Sin embargo, son frecuentes los casos de superparasitismo (Castelo 2003). En este contexto, es interesante estudiar los mecanismos que permitan la discriminación del hospedador para conocer como ocurre la aceptación del hospedador en este parasitoide. Además, es importante conocer si el comportamiento de discriminación aporta eficiencia al proceso de parasitismo, mediante la existencia de mecanismos que permitan evitar el superparasitismo.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo fue evaluar la ocurrencia de la discriminación y aceptación del hospedador en *M. ruficauda*. Particularmente, los objetivos son: 1) analizar si las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar entre hospedadores sanos y parasitados por coespecíficos, 2) estudiar la capacidad de la larva parasitoide para detectar coespecíficos y evitar la competencia por el hospedador previamente al parasitismo, así como también la capacidad de las larvas de *C. signaticollis* para detectar a las larvas de *M. ruficauda*, y 3) analizar bajo qué condiciones el superparasitismo es aceptado por *M. ruficauda*.

Materiales y Métodos

Insectos

Los detalles metodológicos de los experimentos de olfatometría llevados a cabo en este capítulo de la Tesis y la forma de obtención de los insectos se detallan en el Capítulo 2. Se utilizaron como individuos experimentales a larvas de estadio II de *M. ruficauda* provenientes de desoves recolectados a campo y que fueron mantenidas en el laboratorio luego de su nacimiento. Como hospedadores se utilizaron gusanos blancos de la especie *C. signaticollis* con diferente grado de parasitismo. De esta manera se clasificó a las larvas de tercer estadio del hospedador en sanos (sin larvas parasitoides prendidas), monoparasitados (cuando solo había una larva parasitoide aferrada) y superparasitados (cuando más de una larva parasitoide se encontraba aferrada).

Discriminación del hospedador

Con el fin de determinar si las larvas de *M. ruficauda* son capaces de discriminar el estado de parasitismo de sus hospedadores, se realizaron experimentos en el laboratorio utilizando el olfactómetro “gusanos-larvas” descrito en el Capítulo 2. En estos experimentos se utilizaron estímulos de hospedadores vivos sanos y monoparasitados. Se realizaron tres series experimentales y una control (Tabla 4.1.). La serie control se realizó para medir la tendencia de las larvas parasitoides a iniciar movimientos exploratorios. Esto permitió garantizar que las larvas experimentales se encontraban en un buen estado fisiológico durante la búsqueda del hospedador (Tabla 4.1.). Se utilizaron larvas que se encontraban en edades correspondientes al período de intermuda de manera de evitar la influencia de cualquier evento fisiológico que pudiera interferir en la respuesta (Crespo y Castelo 2008). Para esta serie se utilizó solamente el solvente de extracción como solución (en vez de estímulo del hospedador) en ambos extremos de la arena experimental. Esto permitió comparar los movimientos larvales asociados con otros comportamientos además de los relacionados con la búsqueda del hospedador y también detectar cualquier efecto inherente al dispositivo experimental. La solución estímulo y los experimentos comportamentales se realizaron como se describió en el Capítulo 2.

Detección de coespecíficos

Con el fin de determinar si la larva de *M. ruficauda* es capaz de detectar la presencia de coespecíficos se realizaron cuatro series experimentales y una control (Tabla 4.1.), usando el mismo procedimiento experimental y el olfatómetro “extractos-larvas” descrito en el Capítulo 2. Para estos experimentos se utilizaron extractos con hexano de larvas de primer y segundo estadio del parasitoide. Para obtener la solución estímulo, se realizó el mismo procedimiento que antes, pero se prepararon extractos de 200 larvas de *M. ruficauda* por ml.

Detección del parasitoide por el hospedador

En esta sección se estudió si el hospedador puede evitar ser parasitado detectando la presencia del hospedador por medio de claves químicas. Para estos experimentos, el papel de filtro utilizado en cada arena experimental fue sembrado con 20 μ l de cada extracto (500 larvas/ml) de tanto larvas de primer como de segundo estadio de *M. ruficauda* (Tabla 4.1.). Para realizar estos experimentos, se utilizó el olfatómetro “extractos-gusanos” descrito en el Capítulo 2. Se utilizaron homogenatos de larvas de primer y segundo estadio de *M. ruficauda*, dado que en el campo es frecuente la aparición simultánea de larvas de ambos estadios en el suelo.

Aceptación del hospedador

En esta sección se investigó si las larvas de *M. ruficauda* son capaces de determinar la calidad del hospedador de acuerdo a la cantidad de reservas alimenticias que posee, utilizando al peso corporal como indicador de esta condición. Por otra parte, se estudió si el peso corporal del hospedador tiene influencia sobre la decisión que toma el parasitoide de superparasitarlo. Se recolectaron individuos parasitados de *C. signaticollis* en el campo de la misma manera que se explicó en el Capítulo 2. Una vez en el laboratorio, se pesó a cada individuo y se lo clasificó en una

de dos categorías posibles: monoparasitado o superparasitado. Luego, se evaluó si el grado de parasitismo está relacionado con el peso corporal de los hospedadores.

Tabla 4.1. Diseño experimental utilizado en los ensayos de olfatometría para evaluar la ocurrencia de la discriminación del hospedador y evitación de la competencia de las larvas de *M. ruficauda* hacia hospedadores y coespecíficos. Abreviaturas: Mr, larvas de *M. ruficauda*; Cs, larvas de *C. signaticollis*; I, larvas de primer estadio; II, larvas de segundo estadio; I+II, mezcla de larvas de primer o segundo estadio; III, larvas de tercer estadio; C, hexano; CS, extracto de *C. signaticollis* sano; CSmp, extracto de *C. signaticollis* monoparasitado.

(Experimento) Especies	Estadio	Estímulo	N	Descripción
(Discriminación del hospedador) Mr	II	C vs. C	139	Larvas de segundo estadio expuestas a la solución control.
	II	CS vs. C	159	Larvas de segundo estadio expuestas a solución de hospedadores sanos.
	II	CSmp vs. C	315	Larvas de segundo estadio expuestas a solución de hospedadores monoparasitados.
	II	CS vs. CSmp	129	Larvas de segundo estadio expuestas a solución de hospedadores sanos y monoparasitados.
(Detección de coespecíficos) Mr	I	I vs. C	115	Larvas de primer estadio expuestas a solución de larvas de primer estadio.
	I	II vs. C	150	Larvas de primer estadio expuestas a solución de larvas de segundo estadio.
	II	I vs. C	124	Larvas de segundo estadio expuestas a solución de larvas de primer estadio.
	II	II vs. C	151	Larvas de segundo estadio expuestas a solución de larvas de segundo estadio.
	Cs	III	I+II vs. C	57

Análisis estadístico

Para las primeras tres secciones (Discriminación del hospedador, Detección de coespecíficos y Detección del parasitoide por el hospedador) se analizó la preferencia de las larvas de *M. ruficauda* y de *C. signaticollis* por los extremos de la arena experimental contra una distribución al azar mediante Pruebas de bondad de ajuste de χ^2 (Zar 1996). Para la última sección, Aceptación del hospedador, se estudió si el grado de parasitismo (mono o superparasitado) estaba relacionado con el peso corporal del hospedador por medio de ANOVA de una vía. Cuando fue necesario se realizaron adicionalmente comparaciones de Tukey a posteriori (Zar 1996).

Resultados

Discriminación del hospedador

Se encontró que las respuestas de las larvas de *M. ruficauda* hacia estímulos de hospedadores de diferente calidad difirieron. Cuando larvas de segundo estadio fueron expuestas a olores de *C. signaticollis* sanos, estas se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=4,200$, $P=0,0404$, Figura 4.1.). Este resultado es coincidente con el que encontraron Crespo y Castelo (2008). En la siguiente serie de experimentos, en la cual se le presentó a las larvas extracto de *C. signaticollis* monoparasitado, se observó que los individuos se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,070$, $P=0,7917$, Figura 4.1.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas a estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados simultáneamente, las larvas se orientaron significativamente hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador sano ($\chi^2=4,566$, $P=0,0326$, Figura 4.1.). Estos resultados sugieren fuertemente que las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* pueden detectar la calidad de su hospedador por medio de claves químicas y determinar de esta manera si el hospedador está parasitado o no. En el capítulo siguiente veremos que este comportamiento está influenciado por otros factores que pueden provocar diferentes patrones de orientación hacia el hospedador.

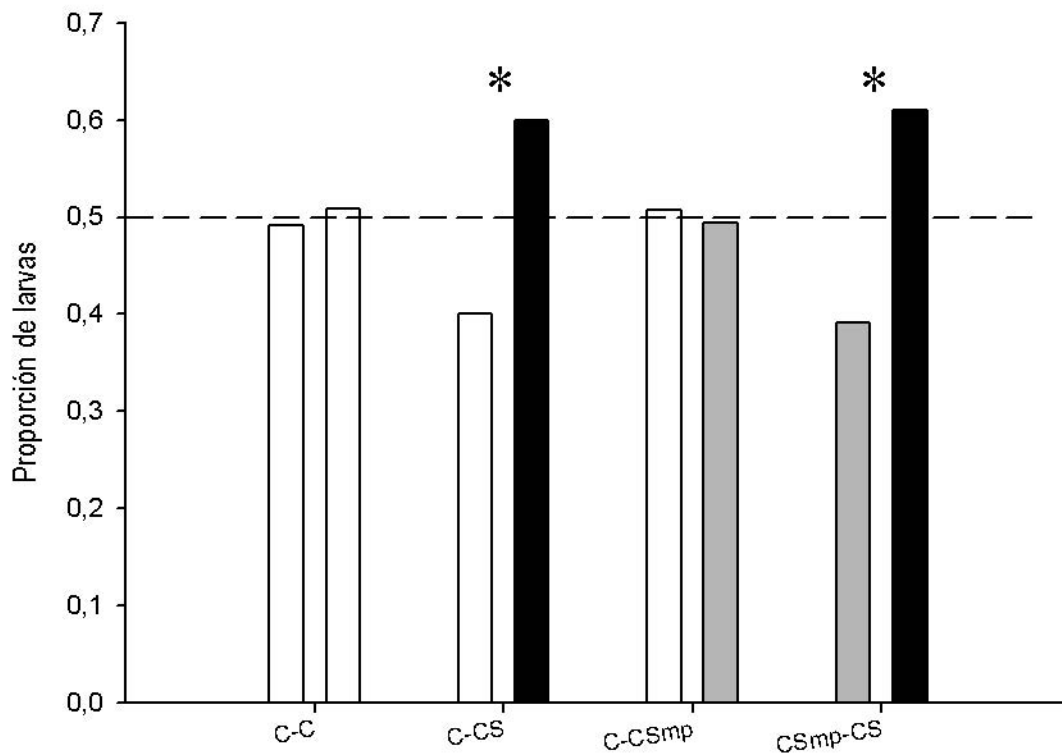


Figura 4.1. Respuesta de orientación al hospedador de las larvas de *M. ruficauda* a extractos de *C. signaticollis* de diferente calidad. Los extractos de hospedadores sanos fueron atractivos para las larvas. Abreviaturas: C, hexano (blanco); CS, extracto de *C. signaticollis* sano (negro); CSmp, extracto de *C. signaticollis* monoparasitado (gris). *: Diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P < 0,05$).

Detección de coespecíficos

La respuesta de las larvas de *M. ruficauda* hacia extractos de coespecíficos de vida libre de diferentes estadios fue similar en todos los casos, independientemente del estadio del parasitoide. Las larvas de primer estadio que fueron expuestas separadamente a extractos de coespecíficos, tanto de primer como de segundo estadio, se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,970$, $P=0,3248$ y $\chi^2=0,539$, $P=0,4631$, respectivamente; Figura 4.2.). De manera similar, las larvas de segundo estadio se distribuyeron al azar cuando se les ofrecieron extractos de coespecíficos de primer y segundo estadio ($\chi^2=1,250$, $P=0,2635$ y $\chi^2=2,560$, $P=0,1096$, respectivamente; Figura 4.2.). Estos resultados sugieren que las larvas de primer y segundo estadio de *M. ruficauda* que forrajejan en el suelo no tienen la capacidad de detectar la presencia de coespecíficos competidores. Sin embargo, cabe la posibilidad que puedan de todos modos realizar el reconocimiento, pero entonces las claves utilizadas por las larvas no serían las olfativas que se utilizaron en estos experimentos, sino que serían de otra naturaleza.

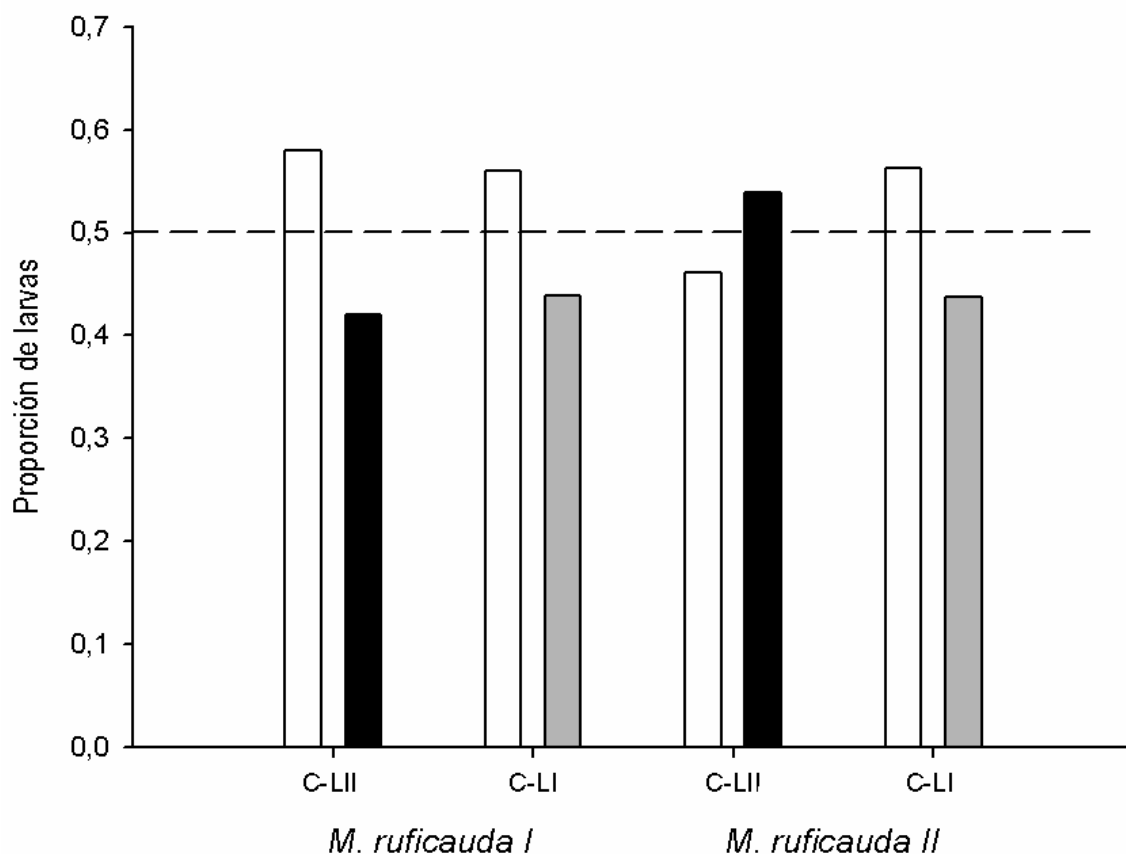


Figura 4.2. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* de primer y segundo estadio a extractos de larvas coespecíficas de diferentes estadios. En todos los casos las larvas se distribuyeron al azar en la arena. Abreviaturas: I, II, larvas de primer y segundo estadio de *M. ruficauda* utilizadas como individuos experimentales; C, hexano, LI, LII, extractos de larvas de primer y segundo estadio de *M. ruficauda*.

Detección del parasitoide por el hospedador

Al analizar la capacidad de *C. signaticollis* de detectar la presencia de las claves químicas de las larvas de los parasitoides, se encontró que las larvas del hospedador se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=1,140$, $P=0,2858$; Figura 4.3.). Estos resultados sugieren que las larvas de *C. signaticollis* no tienen la capacidad de detectar la presencia del parasitoide por medio de claves químicas, pero existe la posibilidad de que puedan hacerlo por medio de claves de diferente naturaleza que las que se ensayaron en estos experimentos.

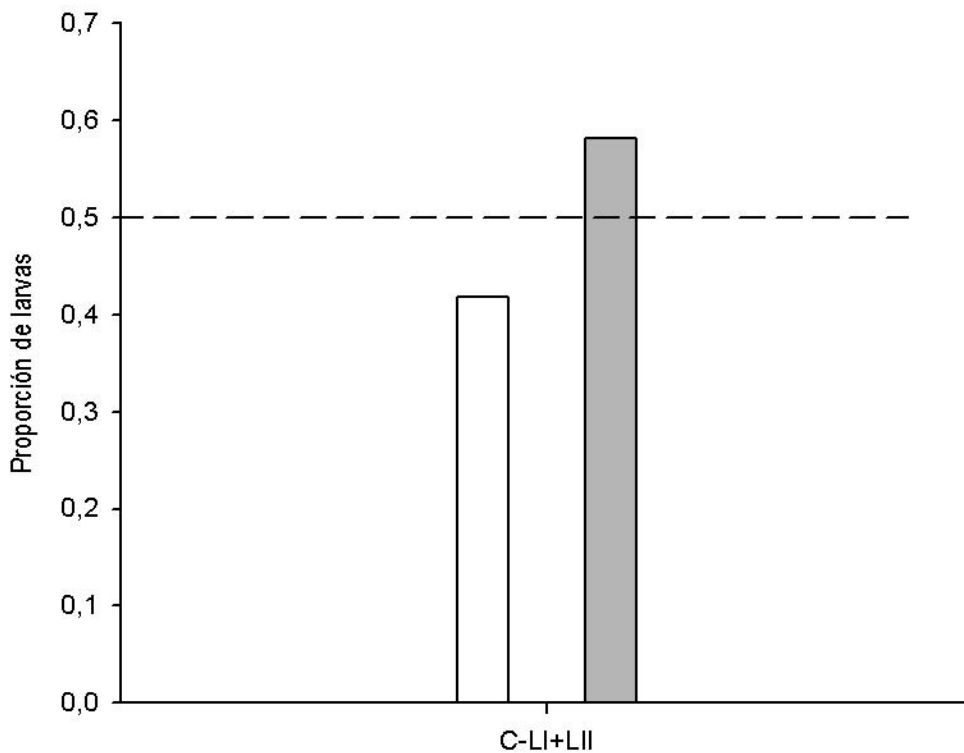


Figura 4.3. Respuesta de orientación de las larvas de *C. signaticollis* a extractos de larvas de *M. ruficauda*. Los hospedadores se distribuyeron al azar en la arena experimental. Abreviaturas: C, hexano; LI+II, extractos de una mezcla de larvas de primer y segundo estadio de *M. ruficauda*.

Aceptación del hospedador

Al analizar la aceptación de hospedadores de diferente calidad por las larvas de *M. ruficauda* se encontró que los hospedadores *C. signaticollis* superparasitados eran frecuentemente los que tenían mayor peso corporal (G.L.=1, F=14,669, P<0,0002). El peso promedio de los hospedadores monoparasitados fue de $0,641 \pm 0,014$ g (media \pm E.S., n=73), mientras que el peso medio de los hospedadores superparasitados fue de $0,713 \pm 0,013$ g (media \pm E.S., n=80).

Discusión

En este capítulo se investigaron los comportamientos de localización y discriminación del hospedador de las larvas de *M. ruficauda*. Particularmente, se intentó determinar si el parasitoide posee mecanismos que le permitan evitar el superparasitismo y la competencia de coespecíficos. Los

resultados aquí presentados muestran que bajo condiciones experimentales, las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* pueden discriminar entre hospedadores sanos y monoparasitados, y se orientan solo hacia hospedadores sanos. Respecto de los mecanismos de evitación del superparasitismo, se encontró que las larvas de *M. ruficauda* no serían capaces de detectar a sus coespecíficos de vida libre, al menos por medio de claves químicas. Adicionalmente, se encontró que el hospedador *C. signaticollis* tampoco puede detectar a las larvas del parasitoide por medio de claves químicas de manera de evitar ser parasitado. Finalmente, se utilizaron datos de campo para analizar la tendencia de los parasitoides de parasitar o superparasitar a *C. signaticollis*. De acuerdo al peso del hospedador, se encontró que el grado de superparasitismo es mayor a medida que el peso aumenta.

Respecto de la localización del hábitat por parte de *M. ruficauda*, Crespo y Castelo (2008) propusieron que el primer estadio larval solamente realiza una búsqueda del hábitat del hospedador. Recién cuando la larva parasitoide muda al segundo estadio, el comportamiento de localización del hospedador se manifiesta conjuntamente con cambios morfológicos en las estructuras cefálicas. Estos autores estudiaron el comportamiento de búsqueda del hospedador en este parasitoide y encontraron que las larvas de segundo estadio se orientan específicamente hacia las claves del hospedador *C. signaticollis*. Esta especificidad coincide con los resultados obtenidos en el campo por Castelo y Corley (2010). Además, Crespo y Castelo (2008) encontraron que las larvas de segundo estadio de todas las edades, tienen la capacidad de buscar al hospedador con igual motivación para iniciar movimientos exploratorios. Sin embargo, hasta aquí, no había información disponible sobre las decisiones que llevan al parasitoide a aceptar un hospedador determinado.

En este trabajo se estudiaron los comportamientos que llevan a la aceptación del hospedador en el campo. Se encontró que las larvas de *M. ruficauda* tienen la capacidad de discriminar entre hospedadores sanos y parasitados, algo muy común entre los himenópteros, pero desconocido para los dípteros Asilidae (Godfray 1994, Vet et al. 2002). Dado que los hospedadores naturalmente difieren en los recursos energéticos que poseen, se ha propuesto que el fitness de la hembra parasitoide está correlacionado con la calidad del hospedador en el cual su progenie se desarrolla (Vet et al. 2002, Brodeur y Boivin 2004). La calidad del hospedador puede variar de acuerdo a

diferentes factores como la especie, el tamaño, la edad, el sexo, el número de larvas parasitoides que porta y el estado nutricional. Los mecanismos desarrollados por los parasitoides para determinar la calidad de un hospedador han sido ampliamente estudiados (Godfray 1994, Vet et al. 2002, Brodeur y Boivin 2004). Por ejemplo, Salt (1935) fue uno de los pioneros en mostrar que *Trichogramma evanescens* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) deja una marca química externa luego de la oviposición lo que previene a otras hembras de atacar al mismo hospedador. Otros parasitoides como *Nasonia vitripennis* Walker y *Leptopilina heterotoma* Thomson (Hymenoptera: Eucoilidae) usan claves químicas internas y son capaces de determinar el tamaño del hospedador (Wylie 1965, King y Skinner 1991, van Lenteren 1972). *Venturia canescens* Gravenhorst (Hymenoptera: Ichneumonidae), por otro lado, puede distinguir entre hospedadores sanos y monoparasitados utilizando su ovipositor (Ganesalingam 1974).

A pesar que la discriminación del hospedador se ha reportado repetidamente en himenópteros y dípteros adultos, existen pocos registros de que las larvas de los parasitoides sean capaces de realizarlo (Brodeur y Boivin 2004). Se ha propuesto que en los parasitoides con larvas de búsqueda activa, particularmente dípteros, no debería haber sido seleccionada la capacidad de discriminar hospedadores dada la baja tasa de encuentros con el hospedador y, por lo tanto, deberían aceptar el superparasitismo más fácilmente (Feener y Brown 1997). Sin embargo, Brodeur y Boivin (2004), proponen que la discriminación del hospedador es ventajosa cuando el hospedador tiene una distribución agregada, donde los encuentros son más probables debido a la proximidad de los individuos. Este escenario permite que el parasitoide encuentre hospedadores de alta calidad más fácilmente.

En los parasitoides coleópteros *A. bilineata* y *A. bipustulata* L. (Coleoptera: Staphylinidae) tanto la discriminación intra como interespecífica se basa principalmente en la detección de claves químicas y parcialmente en la de claves físicas relacionadas con el hueco de entrada en el pupario (Royer et al. 1999). En el caso de *M. ruficauda*, los estudios aquí presentados muestran que la discriminación intraespecífica del hospedador ocurre, dado que en los experimentos de laboratorio se encontró una orientación positiva preferentemente hacia hospedadores sanos cuando estaban disponibles. Adicionalmente, estos resultados muestran que esta preferencia está basada en claves

químicas. Este es el primer registro en el que este comportamiento se encontró en un parasitoide díptero. Este comportamiento podría ser ventajoso en esta especie ya que, como se encontró en el Capítulo 7, las larvas de *M. ruficauda* tienen una alta tasa de supervivencia durante la fase de vida libre que les permitiría aumentar la probabilidad de encontrar y evaluar a muchos hospedadores durante su vida.

Dado que las larvas de *M. ruficauda* son capaces de detectar olores, y que son parasitoides solitarios, era relevante estudiar si la detección química de coespecíficos ocurre de manera de evitar el superparasitismo. Los resultados indican que las larvas parasitoides no son capaces de detectar a los coespecíficos, al menos por medio de claves químicas. Además, esto sugiere que no existiría un mecanismo de evitación de competidores previo al parasitismo en este sistema. Como consecuencia de este fenómeno, cualquier larva parasitoide que este buscando a un hospedador tendría las mismas posibilidades de parasitarlo. Sin embargo, se ha observado en el laboratorio la ocurrencia de ataques físicos entre larvas criadas comunitariamente a una elevada densidad, lo que sugiere que existirían interacciones agonistas entre los individuos que se encuentran en competencia y podría entenderse como parte de una estrategia de evitación. Por otro lado, no se encontró que el hospedador sea capaz de detectar la presencia de la larva parasitoide que forrajea en su microambiente, lo que apoya la idea de que las larvas de *M. ruficauda* podrían no estar liberando olores, lo que trae aparejado que el hospedador no pueda iniciar ninguna acción de defensa. Sin embargo, es posible que el hospedador cuente con algún mecanismo de detección, ya que posee un elevado número de pelos largos en toda la cutícula que podrían estar actuando como sensores mecánicos que darían aviso de la aproximación de las larvas previo al ataque.

La detección de claves químicas de individuos coespecíficos es un fenómeno que ocurre al menos en otros parasitoides. Por ejemplo, Royer et al. (1999) mostró que *A. bilineata* disminuye su criterio de selección respecto de hospedadores previamente parasitados cuando la densidad de la población de larvas parasitoides es elevada. Esto indica que, al menos en *A. bilineata*, el parasitoide puede detectar la presencia de competidores previamente al parasitismo. Hay estudios que muestran que efectivamente la competencia existe en los parasitoides adultos principalmente mediante el cuidado del parche o por superparasitismo (van Alphen y Bernstein 2008). En cuanto a los estados

inmaduros, la competencia se expresa una vez que el parasitismo ha ocurrido. Las larvas parasitoides de algunas especies entran en combate con los competidores a través de ataques físicos o por supresión fisiológica (Salt 1961, Vinson 1972, Mackauer 1990, van Baaren y Nemon 1996, Quicke 1997). En el caso de *M. ruficauda*, aun no se tienen indicios si la competencia existe en los hospedadores superparasitados luego del ataque, por lo que se necesitan más estudios para entender completamente este proceso.

A pesar que *M. ruficauda* puede discriminar y evaluar la capacidad de los hospedadores respecto del grado de parasitismo, el superparasitismo sigue ocurriendo. De acuerdo a la teoría, la aceptación del superparasitismo en los parasitoides solitarios está fuertemente influenciada por el número de hembras que se encuentran en el mismo parche, así como también por la probabilidad de supervivencia de su descendencia (McBrien y Mackauer 1991, Sirot et al. 1997, Vet et al. 2002). En cuanto a los parasitoides con larvas con búsqueda activa, el superparasitismo podría ser ventajoso si la probabilidad de vencer la contienda con un parasitoide que se encuentra ya presente es mayor que la probabilidad de sobrevivir hasta el encuentro con un hospedador sano (Godfray 1994, Brodeaur y Boivin 2004). En el caso de *M. ruficauda* se encontró que el superparasitismo ocurre consistentemente en los hospedadores de mayor peso. Este resultado podría indicar que los hospedadores con los mayores pesos corporales son aquellos que poseen una calidad mayor para albergar más de una larva parasitoide dado que poseen mayores recursos energéticos, y por consiguiente son más susceptibles a ser superparasitados. Por otro lado, las larvas de *M. ruficauda* podrían cuantificar la cantidad de recursos que un hospedador dado presenta previo al parasitismo, dado que se ha visto que una vez que la larva ha parasitado al hospedador, nunca se desprende hasta que el hospedador muda al tercer estadio o muere (Castelo, datos no publicados). En resumen, se encontró que *M. ruficauda* puede discriminar a los hospedadores de acuerdo al estado de parasitismo y también por la cantidad de reservas energéticas que representan. Sin embargo, no se encontraron evidencias de que haya detección de coespecíficos de vida libre, lo cual significa que no existiría evitación de la competencia previamente al parasitismo, y esto se debería a la falta de claves químicas en la larva del parasitoide. Adicionalmente, se encontró que las larvas de *M. ruficauda* no se orientan hacia los hospedadores monoparasitados y los evitan en presencia de hospedadores sanos.

Se sabe que el estado interno puede influenciar el comportamiento de explotación de parche o de búsqueda del hospedador de los parasitoides (Mangel 1993, Godfray 1994, Sirot et al. 1997, Sisterton y Averill 2002, Desouhant et al. 2005, Bernstein y Jervis 2008). Por ejemplo, las hembras de *Phanerotoma franklini* Gahan (Hymenoptera: Braconidae) al estar deprivadas de azúcares, aumentan los movimientos asociados con el forrajeo (Sisterton y Averill 2002). También se ha visto que hembras de un día de edad de *Cotesia rubecula* Marshall (Hymenoptera: Braconidae) bien alimentadas tienen una preferencia por el hospedador, mientras que avispas no alimentadas visitan hospedadores y flores en búsqueda de alimento en experimentos con un túnel de viento (Siekmann et al 2004). Desouhant et al. (2005) estudiaron la estado-dependencia nutricional sobre la elección del olor en *V. canescens* y encontraron que las avispas deprivadas de alimento con anterioridad al experimento eligen sitios donde co-ocurren tanto el alimento como los hospedadores. En el caso de *M. ruficauda*, se estudió la tendencia de realizar movimientos exploratorios y se encontró que este es constante a lo largo de todo el segundo estadio, lo que indica que el aumento del riesgo de muerte no modifica estos comportamientos. Sin embargo, no se ha explorado si las decisiones de la aceptación del hospedador son estado-dependientes. Se podría esperar que la orientación hacia hospedadores monoparasitados cambie dependiendo del estado nutricional del parasitoide o de la cercanía con la muerte. Además, el estado interno podría influenciar la aceptación de hospedadores de baja calidad lo que podría llevar a una reducción del fitness. En el siguiente capítulo se discutirá sobre la influencia del estado interno sobre estos comportamientos.

CAPÍTULO 5

EFECTO DE LOS FACTORES EXTERNOS, INTERNOS Y LA ESTADO-DEPENDENCIA EN LA ORIENTACIÓN Y ACEPTACIÓN DEL HOSPEDADOR EN *Mallophora ruficauda*

Introducción

Los animales deben obtener recursos del ambiente para poder crecer, desarrollarse y reproducirse. Sin embargo, la tarea de encontrar los recursos en un ambiente heterogéneo puede ser complicada. Particularmente para los parasitoides, la búsqueda de alimento implica, además de localizar fuentes de alimentación, buscar hospedadores adecuados donde oviponer (Godfray 1994). El forrajeo en un ambiente donde los recursos no se distribuyen de manera homogénea requiere de un adecuado mecanismo de adquisición de la información de manera de poder decidir que parche es el que ofrece los mejores recursos y cuanto tiempo se debe permanecer en ese sitio (van Alphen et al. 2003). A diferencia de los animales con una alta expectativa de vida como los mamíferos o las aves, los insectos, y particularmente los parasitoides, deben comenzar a forrajear y, por lo tanto, adquirir la información relevante del ambiente, al mismo tiempo que comienzan a reproducirse, que en general es inmediatamente después de la emergencia como adulto. Esto supone que los parasitoides tienen una restricción en la información disponible al momento de buscar alimento u hospedadores (van Alphen et al. 2003). A pesar de esto, los parasitoides obtienen mucha información sobre el ambiente por medio de estímulos químicos, que compensaría en cierta manera esa restricción.

Los estímulos químicos pueden proveer de información respecto de la distribución de hospedadores en el ambiente, así como también pueden indicar la calidad de un parche determinado (Vet et al. 2003). Una vez obtenida la información respecto de un parche de recursos, los parasitoides pueden comportarse siguiendo mecanismos incrementales o decrementales al momento de forrajear en ese lugar (van Alphen et al. 2003). Los mecanismos incrementales son aquellos en los que a mayor tasa de encuentro de hospedadores sanos, mayor es el tiempo de residencia en el parche (van Alphen et al. 2003). Por otro lado, los mecanismos decrementales son aquellos mediante los cuales a mayor número de oviposiciones, menor es el tiempo de permanencia en un parche. La ocurrencia de un mecanismo u otro en una especie está relacionada con la densidad de los hospedadores. Las especies de parasitoides que se encuentran forrajeando hospedadores con distribución agregada, es decir donde hay una alta variabilidad en el número de hospedadores por parche, en general utilizan mecanismos incrementales. Por otra parte, si los parasitoides se encuentran forrajeando hospedadores

con una distribución uniforme, es decir una baja variabilidad en el número de hospedadores por parche, muestran mecanismos decrementales (van Alphen et al. 2003).

Existen especies de parasitoides que utilizan uno u otro mecanismo (van Alphen et al. 2003). El estudio de estos mecanismos ha llevado al desarrollo de modelos hipotetizando el comportamiento óptimo de los parasitoides bajo determinadas circunstancias (Iwasa et al. 1984, Sirot y Bernstein 1997, van Alphen et al. 2003). Sin embargo, la mayoría de los modelos tiene como supuesto que el parasitoide tiene la capacidad de adquirir la información de manera fiable y eficiente. La capacidad de discriminación en los parasitoides ha sido muy estudiada y es común en muchas de las especies (Ver Capítulo 4). Esta capacidad de discriminar hospedadores permite a los parasitoides optimizar los recursos ya que logran disminuir el costo que implicaría parasitar o alimentarse de un hospedador sub-óptimo de menor calidad que contribuye de manera menor al fitness.

A pesar que los hospedadores sub-óptimos deberían ser evitados, existen modelos que explican y predicen que, bajo determinadas circunstancias, estos deberían ser aceptados. Esto se debe principalmente a que la información adquirida está influenciada por distintos factores que pueden derivar en una interpretación diferente. Estos factores que tienen influencia en los comportamientos pueden ser externos o internos al individuo (ver Introducción General).

Los factores externos son aquellos como la presión barométrica, la temperatura, densidad de competidores o de presas que influyen sobre los comportamientos de los insectos (Godfray 1994). En los parasitoides, las condiciones ambientales tienen influencia sobre todo en el comportamiento de localización del hospedador (Amat et al. 2006). Esto es así porque un empobrecimiento de las condiciones ambientales, tales como una súbita disminución en la presión barométrica o en la temperatura, son indicadores fuertes de un desmejoramiento del estado del tiempo o el advenimiento de una tormenta (Roitberg et al. 1993). Existen pocos casos donde se estudió el efecto de un cambio de presión sobre el comportamiento de los parasitoides. Se ha visto que una disminución en la presión barométrica provoca un mayor tiempo de residencia en el parche, lo que influye directamente sobre la búsqueda del hospedador (Roitberg et al. 1993, Amat et al. 2006). Por otro lado, la densidad de hospedadores, el sexo y la edad de estos son factores de suma importancia para determinar el

éxito de parasitismo. Se ha visto que en ocasiones los parasitoides se encuentran con una oferta de hospedadores sub-óptimos en cuanto a estas características a lo largo de su vida y es entonces cuando disminuye el umbral de selección.

Los factores internos se refieren a todas las influencias y restricciones originadas desde dentro del organismo, como las características que confieren el genotipo de un organismo, así como el efecto de la experiencia y las características adquiridas (Cardé y Bell 1995). Entre las variables fisiológicas que influyen se encuentran: los niveles de energía (reservas corporales), edad, experiencia previa, carga parasitaria, tamaño, capacidad de aprendizaje y el estado motivacional. Existen muchos trabajos que muestran la influencia que tienen estas variables fisiológicas sobre los comportamientos de los insectos, sin embargo, pocos trabajos estudiaron el efecto del estado interno sobre la localización y aceptación del hospedador en parasitoides (Cardé y Bell 1995, Wajnberg et al. 2008).

La biología y ecología del insecto determinan que factores tendrán más influencia sobre los comportamientos a lo largo de su vida. Como ya se ha explicado en capítulos anteriores, *M. ruficauda* es un parasitoide solitario. Las larvas recién al mudar al segundo estadio adquieren la capacidad de orientarse a su hospedador (Capítulo 3). Sin embargo, las hembras de *M. ruficauda* comienzan a oviponer en diciembre, mientras que el hospedador de tercer estadio aparece en febrero. Este desfase entre la aparición del parasitoide y el hospedador genera que las primeras larvas deban utilizar hospedadores sub-óptimos o esperar a la aparición del hospedador óptimo. De esta manera, la edad es un factor importante en este sistema, ya que pueden coexistir larvas parasitoides muy longevas con larvas muy jóvenes. Por otra parte, las larvas de *M. ruficauda* al nacer son dispersadas por el viento. Esta dispersión anemófila implica que las larvas al nacer dependen de las condiciones eólicas para ser dispersadas, como ser la velocidad e intensidad del viento (Castelo et al. 2006). Esta situación genera que haya algunos desoves cuyas larvas no logren ser dispersadas separadamente y caigan todas juntas al suelo en el mismo lugar. De esta manera, en esta situación existirían muchas larvas competidoras potenciales en una zona del suelo muy reducida. Por lo tanto, la densidad de coespecíficos es un factor importante en la ecología de este sistema.

Dado este escenario biológico, se desconocen los mecanismos mediante los cuales las larvas de *M. ruficauda* pueden alcanzar a parasitar de forma eficiente a un hospedador óptimo, como también si la orientación y aceptación del hospedador es dependiente del estado interno de la larva. Por lo tanto, el objetivo de este Capítulo fue determinar si el proceso de búsqueda del hospedador en la larva de *M. ruficauda* es estado-dependiente, particularmente si la orientación y aceptación del hospedador son comportamientos afectados por factores internos tales como la edad y factores externos tales como la densidad de competidores coespecíficos. Se espera que las larvas en condiciones de alta competencia y longevas se orienten y acepten hospedadores sub-óptimos en mayor proporción que las larvas jóvenes y solitarias.

Materiales y Métodos

Insectos

Los detalles metodológicos de los experimentos de olfatometría llevados a cabo en este capítulo de la Tesis y la forma de obtención de los insectos se detallan en el Capítulo 2. Se utilizaron como individuos experimentales a larvas de estadio II de *M. ruficauda* provenientes de desoves recolectados a campo y que fueron mantenidas en condiciones de laboratorio luego de su nacimiento. En este Capítulo se realizaron experimentos tendientes a determinar si hay influencia de la edad y de la densidad de competidores coespecíficos en la orientación y aceptación de hospedadores sub-óptimos en las larvas de *M. ruficauda*. Se utilizaron larvas mantenidas bajo los distintos métodos de cría según la presencia o ausencia de coespecíficos (solitarias o comunitarias, respectivamente) y de distintas edades (jóvenes o longevas).

Particularmente, para los experimentos realizados en este Capítulo, se realizaron tratamientos con las larvas que consistieron en mantenerlas hasta el momento de realizar los experimentos en cuatro condiciones diferentes, que resultan de la manipulación de los factores densidad de competidores coespecíficos y edad de las larvas. Por un lado, para la condición de competencia, se realizó un tratamiento denominado “Solitarias” donde se utilizaron larvas que fueron separadas

individualmente en tubos de la misma manera que las utilizadas en los capítulos anteriores. Estas larvas se encuentran en situación de no estrés, es decir, que no experimentan la competencia intraespecífica previa al parasitismo. Luego, el tratamiento denominado “Comunitarias” consistió en mantener a las larvas de diferentes desoves en forma gregaria en un mismo recipiente con un papel de filtro humedecido en la base. Estas larvas se encuentran en una alta densidad de competidores coespecíficos (aproximadamente 20 larvas/cm²). Por otro lado se realizaron dos tratamientos con larvas de diferente edad. Se utilizaron larvas de entre 19-27 días de vida (considerando 7 días como larvas de estadio I) como larvas “Jóvenes” y entre 45-65 días de vida como larvas “Longevas”. Tanto para el tratamiento “Solitarias” como “Comunitarias” se utilizaron larvas de las edades indicadas como “Jóvenes” y “Longevas”.

Como hospedadores se utilizaron gusanos blancos de la especie *C. signaticollis* de diferente estadio y con diferente grado de parasitismo. De esta manera se clasificó a los hospedadores en función de su estadio en I, II y III (CSI, CSII y CSIII, respectivamente) y a las larvas de tercer estadio del hospedador en sanos (sin larvas parasitoides prendidas, CS) y monoparasitados (cuando solo había una larva parasitoide aferrada a su cuerpo, CSmp). Así, se ubicó a los hospedadores en las categorías “Óptimos” (CSIII y CS) y “Sub-óptimos” (CSI, CSII y CSmp) (Tablas 5.1. y 5.2.). Cabe destacar que a pesar que *M. ruficauda* parasita en algunas ocasiones a otras especies de gusanos blancos, para los alcances de esta Tesis sólo se tuvieron en cuenta a los hospedadores sub-óptimos de la especie *C. signaticollis*, debido a que es la más seleccionada a campo (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010).

Orientación hacia hospedadores sub-óptimos

A. Grado de parasitismo

En esta serie de experimentos se estudió si la edad y densidad de competidores influye sobre la orientación hacia hospedadores sub-óptimos de la especie *C. signaticollis* monoparasitados. Como se estudió en el Capítulo 4, las larvas recién mudadas a estadio II de *M. ruficauda* no se orientan hacia olores de hospedadores monoparasitados. Se realizaron experimentos en el laboratorio

utilizando el olfatómetro “extractos-larvas” descrito en el Capítulo 2. En estos experimentos se utilizaron soluciones de estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados. Se realizaron dos series control y dos experimentales para cada tratamiento (Tabla 5.1.). Una serie control C-C se realizó como se explica en el Capítulo 2. La otra serie control (CS-C) permitió controlar la orientación hacia los hospedadores sanos para garantizar que las larvas experimentales se encontraban en un buen estado fisiológico durante la búsqueda del hospedador y poder asegurar que se observe la respuesta a los tratamientos con extractos de hospedadores sub-óptimos (Tabla 5.1.). Por otro lado, para las series experimentales, se utilizaron extractos de hospedadores monoparasitados y sanos. En la serie CSmp-C, se estudió la orientación de las larvas bajo cada uno de los cuatro tratamientos hacia olores de hospedador monoparasitado. Luego, la otra serie experimental CSmp-CS se realizó para estudiar la preferencia de las larvas por olores de hospedadores sanos o parasitados presentados simultáneamente (Tabla 5.1.). Las soluciones estímulo y los experimentos comportamentales se realizaron como se describió en el Capítulo 2.

Tabla 5.1. Diseño experimental utilizado para evaluar la influencia de la edad de la larva y la densidad de coespecíficos en la discriminación y orientación hacia hospedadores sanos y monoparasitados. Abreviaturas: C, hexano; CS, extracto de *C. signaticollis* sano; CSmp, extracto de *C. signaticollis* monoparasitado. N: Número de larvas totales. Entre paréntesis figura el número de larvas que se encontraron en alguna de las zonas laterales de la arena experimental.

Estímulo	Edad / Densidad de coespecíficos					Descripción
	Jóvenes		Descripción	Longevas		
	Solitarias N	Comunitarias N		Solitarias N	Comunitarias N	
C-C	140 (97)	122 (99)	Larvas expuestas a solución control	138 (107)	127 (87)	Larvas expuestas a solución control
C-CS	456 (347)	141 (106)	Larvas expuestas a solución de hospedadores sanos	157 (116)	112 (84)	Larvas expuestas a solución de hospedadores sanos
C-CSmp	420 (312)	270 (209)	Larvas expuestas a solución de hospedadores monoparasitados	132 (93)	236 (168)	Larvas expuestas a solución de hospedadores monoparasitados
CSmp-CS	142 (106)	137 (104)	Larvas expuestas a solución de hospedadores sanos y monoparasitados	197 (126)	146 (93)	Larvas expuestas a solución de hospedadores sanos y monoparasitados

Tabla 5.2. Diseño experimental utilizado para evaluar la influencia de la edad de la larva y la densidad de coespecíficos en la discriminación y orientación hacia hospedadores de diferente estadio. Abreviaturas: C, hexano; CSI, extracto de *C. signaticollis* de primer estadio; CSII, extracto de *C. signaticollis* de segundo estadio; CS III, extracto de *C. signaticollis* de tercer estadio. N: Número de larvas totales. Entre paréntesis figura el número de larvas que se encontraron en alguna de las zonas laterales de la arena experimental.

Estímulo	Edad / Densidad de coespecíficos					Descripción
	Jóvenes		Descripción	Longevas		
	Solitarias	Comunitarias		Solitarias	Comunitarias	
	N	N		N	N	
C-C	140 (97)	122 (99)	Larvas expuestas a solución control	138 (107)	127 (87)	Larvas expuestas a solución control
C-CSI	130 (87)	134 (100)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio I	138 (93)	150 (76)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio I
C-CSII	137 (108)	141 (102)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio II	187 (128)	139 (92)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio II
C-CSIII	456 (347)	141 (106)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio III	157 (116)	112 (84)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio III
CSII-CSIII	150 (95)	132 (94)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio II y III	130 (63)	142 (75)	Larvas expuestas a solución de hospedadores de estadio II y III

B. Estadio del hospedador

En esta serie de experimentos se estudió si la edad y densidad de competidores influye sobre la orientación hacia hospedadores de la especie *C. signaticollis* pero de diferentes estadios larvales. Se realizaron los mismos tratamientos que en la sección anterior (Grado de parasitismo). Se realizaron experimentos en el laboratorio utilizando el olfatómetro “extractos-larvas” descrito en el Capítulo 2. En estos experimentos se utilizaron estímulos de hospedadores de estadio I, II y III. Se realizaron dos series control y tres experimentales para cada tratamiento (Tabla 5.2.). Se realizaron las mismas dos series control que para la sección anterior (C-C, CS-C). Por otro lado, para las series experimentales, se utilizaron extractos de hospedadores de diferentes estadios. En las series CSI-C y CSII-C, se estudió la orientación de las larvas hacia olores de hospedadores sub-óptimos de diferentes estadios. Luego, la última serie experimental CSII-CSIII, se realizó para estudiar la preferencia de las larvas por olores de hospedadores de segundo o tercer estadio presentados

simultáneamente (Tabla 5.2.), dado que se ha observado ocasionalmente a campo a larvas de *M. ruficauda* parasitando a este estadio del hospedador. Las soluciones estímulo y los experimentos comportamentales se realizaron como se describió en el Capítulo 2.

Aceptación del hospedador

Para esta sección las larvas se sometieron a los mismos tratamientos que en la sección Orientación hacia hospedadores sub-óptimos. Primero, se evaluó la aceptación del hospedador en función del grado de parasitismo del hospedador (Tabla 5.3.). Luego, en un segundo grupo de experimentos se evaluó la aceptación del parasitismo frente a larvas de *C. signaticollis* de diferentes estadios (Tabla 5.4.). Cada experimento consistió en realizar el parasitismo artificial de los hospedadores con larvas de los cuatro tratamientos. Para realizar el parasitismo artificial se colocó al hospedador con la larva parasitoide dentro del tubo con tierra donde se lo mantuvo durante el proceso de parasitismo (Figura 5.1b.). Luego, se colocó una larva de estadio II de *M. ruficauda* sobre el abdomen del hospedador con la ayuda de un pincel (Figura 5.1c.). Al cabo de tres días, se examinó al hospedador bajo lupa para determinar si la larva parasitoide estaba aferrada a su cutícula.

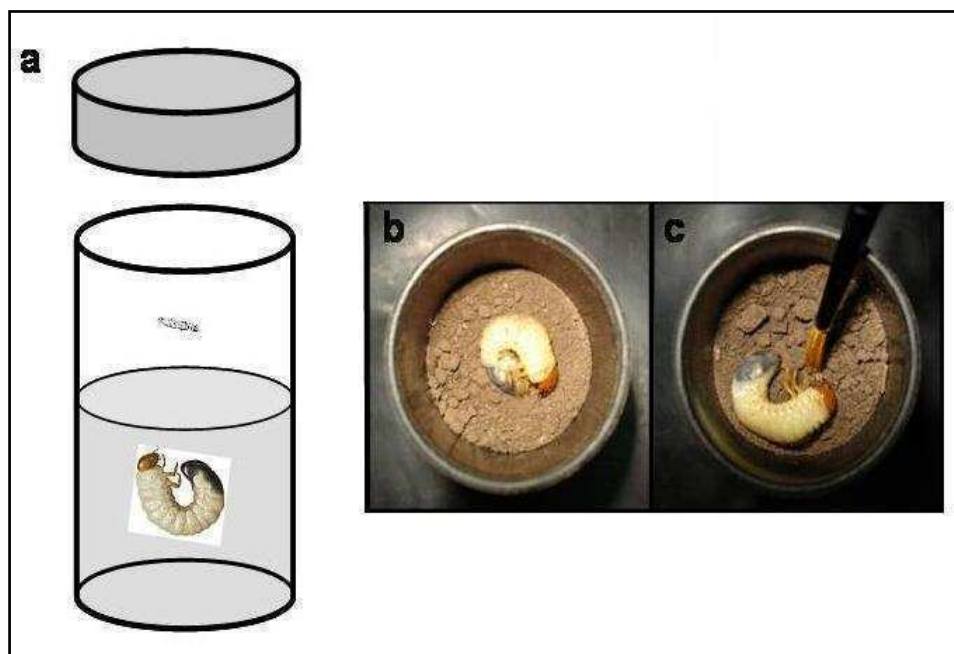


Figura 5.1. Dispositivo experimental utilizado para realizar el procedimiento de parasitismo artificial. a) Esquema donde se observa a la larva parasitoide dentro del recipiente con el hospedador. b) Vista superior del recipiente donde se distingue el hospedador. c) Colocación de la larva parasitoide sobre el cuerpo del hospedador con un pincel. Figura tomada de Barrantes (2009).

Estos experimentos se realizaron con el fin de analizar si existe concordancia entre los comportamientos en las larvas que se orientan positivamente hacia un determinado estímulo y la aceptación y aferramiento al hospedador del cual proviene ese estímulo. Para estos experimentos se realizó un experimento control que consistió en ofrecerle un hospedador poco elegido a campo, *P. bonariensis*, a las larvas de cada uno de los tratamientos (Tabla 5.3.).

Tabla 5.3. Diseño experimental utilizado para evaluar la influencia de la edad de la larva y la densidad de coespecíficos en la aceptación de hospedadores sanos y monoparasitados. Abreviaturas: CsIII, larvas de *C. signaticollis* de tercer estadio; Csm, larvas de *C. signaticollis* de tercer estadio monoparasitados; Pb, larvas de *P. bonariensis* de tercer estadio. N: Número de larvas empleadas en los experimentos.

Estímulo	Edad / Densidad de coespecíficos					Descripción
	Jóvenes		Descripción	Longevas		
	Solitarias N	Comunitarias N		Solitarias N	Comunitarias N	
Cs III	41	22	Larvas expuestas a hospedadores sanos	24	225	Larvas expuestas a hospedadores sanos
Csm	29	100	Larvas expuestas a hospedadores monoparasitados	40	53	Larvas expuestas a hospedadores monoparasitados
Pb	35	8	Larvas expuestas a hospedadores poco seleccionados	54	8	Larvas expuestas a hospedadores poco seleccionados

Análisis estadístico

Cada sección (Grado de parasitismo y Estadio del hospedador) se analizó separadamente en los dos bloques de experimentos (Orientación hacia hospedadores sub-óptimos y Aceptación del hospedador). Se analizó la preferencia de las larvas de *M. ruficauda* por cualquiera de los extremos de la arena experimental contra una distribución al azar mediante Pruebas de Bondad de Ajuste de Chi-cuadrado (Zar 1996). La aceptación del parasitismo se evaluó mediante una Prueba de Comparación de Dos Proporciones (Zar 1996).

Tabla 5.4. Diseño experimental utilizado para evaluar la influencia de la edad de la larva y la densidad de coespecíficos en la aceptación de hospedadores de diferentes estadios. Abreviaturas: C, hexano; CSI, extracto de *C. signaticollis* de primer estadio; CS II, extracto de *C. signaticollis* de segundo estadio; CS III, extracto de *C. signaticollis* de tercer estadio. N: Número de larvas empleadas en los experimentos.

Estímulo	Edad / Densidad de coespecíficos					
	Jóvenes		Descripción	Longevas		Descripción
	Solitarias N	Comunitarias N		Solitarias N	Comunitarias N	
CsII	15	33	Larvas expuestas a hospedadores de segundo estadio	18	7	Larvas expuestas a hospedadores de segundo estadio
CsIII	41	72	Larvas expuestas a hospedadores de tercer estadio	40	225	Larvas expuestas a hospedadores de tercer estadio

Resultados

Orientación hacia hospedadores sub-óptimos

A. Grado de parasitismo

Se encontró que las respuestas de orientación hacia el hospedador de la larva de *M. ruficauda* hacia los estímulos de *C. signaticollis* de tercer estadio fueron diferentes en función del grado de parasitismo que presentaba el hospedador, edad de la larva parasitoide y densidad de competidores coespecíficos.

Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica

En el capítulo 4, se realizaron los experimentos con larvas “Jóvenes solitarias” y se encontró que las respuestas de orientación de *M. ruficauda* hacia estímulos de hospedadores de diferente calidad difirieron (ver detalles experimentales en la sección Discriminación del hospedador). Cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), las larvas de *M. ruficauda* se distribuyeron al

azar en la arena experimental ($\chi^2=0,010$, $P>0,05$, Figura 5.1.). Particularmente, cuando las larvas de segundo estadio fueron expuestas a olores de *C. signaticollis* sanos, los individuos se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=16,21$, $P<0,001$, Figura 5.1.). En cambio, cuando las larvas fueron expuestas al extracto de *C. signaticollis* monoparasitado, los individuos se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=1,282$, $P>0,05$, Figura 5.1.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas a estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados simultáneamente, las larvas se orientaron significativamente hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador sano ($\chi^2=4,566$, $P<0,05$, Figura 5.1.).

En el caso de las larvas de segundo estadio bajo el tratamiento “Longevas solitarias”, se encontró que cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), las larvas de *M. ruficauda* se distribuyeron al azar ($\chi^2=0,234$, $P>0,05$, Figura 5.1.). En cambio, cuando las larvas fueron expuestas a olores de *C. signaticollis* sanos, los individuos se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=5,828$, $P<0,05$, Figura 5.1.). En la siguiente serie de experimentos, en la cual se le presentó a las larvas de *M. ruficauda* el extracto de *C. signaticollis* monoparasitado, los individuos se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,011$, $P>0,005$, Figura 5.1.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados, los individuos se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,286$, $P>0,05$, Figura 5.1.).

Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos

En cuanto a las larvas bajo el tratamiento “Jóvenes comunitarias” se encontró que al no ser expuestas a los estímulos (serie C-C) se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,091$, $P>0,05$, Figura 5.1.). En cambio, cuando las larvas fueron expuestas a olores de *C. signaticollis* sanos, se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=16,623$, $P<0,001$, Figura 5.1.). Cuando se les presentó extracto de *C. signaticollis* monoparasitado, las larvas de *M. ruficauda* también se orientaron en mayor medida hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador monoparasitado ($\chi^2=11,488$, $P<0,001$, Figura 5.1.). Por

último, cuando las larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados, las larvas se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=1,385$, $P>0,05$, Figura 5.1.).

Finalmente, para las larvas “Longevas comunitarias”, cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), las larvas de *M. ruficauda* se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=3,322$, $P>0,05$, Figura 5.1.). En cambio, cuando se expusieron a olores de *C. signaticollis* sanos, los individuos se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=5,114$, $P<0,025$, Figura 5.1.). Luego, cuando se les presentó el extracto de *C. signaticollis* monoparasitado, las larvas de *M. ruficauda* se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,857$, $P>0,05$, Figura 5.1.). De igual modo, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores sanos y monoparasitados, las larvas también distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,871$, $P>0,05$, Figura 5.1.).

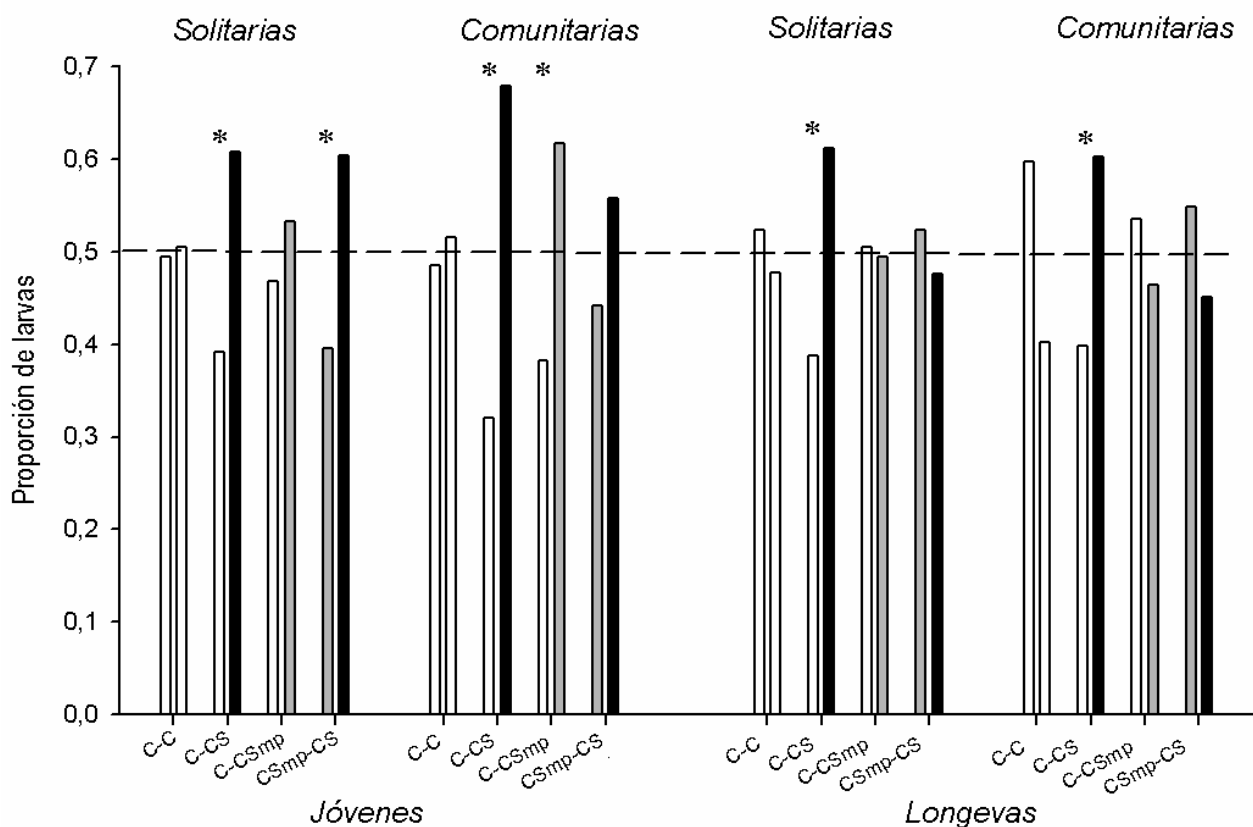


Figura 5.1. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* de diferente condición a extractos de *C. signaticollis* de diferente calidad. En todos los casos, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron hacia extractos de *C. signaticollis* sanos y solamente las larvas “Jóvenes comunitarias” lo hicieron también hacia olores de hospedadores monoparasitados. Abreviaturas: C, hexano; CS, extracto de hospedador sano; CSmp, extracto de hospedador monoparasitado; *: Diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P<0,05$).

B. Estadio del hospedador

Se encontró que las respuestas de orientación hacia el hospedador de la larva de *M. ruficauda* hacia los estímulos de *C. signaticollis* de tercer estadio fueron diferentes en función del estadio del hospedador, edad de la larva parasitoide y densidad de competidores coespecíficos.

Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica

En cuanto a las larvas bajo el tratamiento “Jóvenes solitarias”, cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), se distribuyeron al azar en la arena ($\chi^2=0,010$, $P>0,05$, Figura 5.2.). Cuando las larvas fueron expuestas a olores de *C. signaticollis* de primer y segundo estadio, los individuos también se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,115$ y $0,593$, respectivamente, $P>0,05$, Figura 5.2.). En cambio, cuando se les presentó a los individuos el extracto de *C. signaticollis* de tercer estadio, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron significativamente hacia la zona de la arena donde se encontraba el estímulo ($\chi^2 = 16,210$, $P < 0,001$, Figura 5.2.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores de segundo y tercer estadio, las larvas se orientaron hacia la zona donde se encontraba el olor a hospedadores de tercer estadio ($\chi^2 = 4,462$, $P < 0,05$, Figura 5.2.).

Para el caso de las larvas “Longevas solitarias” se encontró que cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), se distribuyeron al azar ($\chi^2 = 0,091$, $P > 0,05$, Figura 5.2.). Luego, al ser expuestas a olores de *C. signaticollis* de primer y segundo estadio, los individuos se distribuyeron también al azar en la arena experimental ($\chi^2 = 0,871$ y $1,531$, $P > 0,05$, Figura 5.2.). En cambio, cuando se les presentó el extracto de *C. signaticollis* de tercer estadio, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron significativamente hacia la zona de la arena donde se encontraba el estímulo ($\chi^2=5,828$, $P<0,025$, Figura 5.2.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores de segundo y tercer estadio, las larvas se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=1,286$, $P>0,05$, Figura 5.2.).

Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos

En cuanto a las larvas “Jóvenes comunitarias”, cuando no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,091$, $P>0,05$, Figura 5.2.). De igual modo, cuando se expuso a las larvas a olores de *C. signaticollis* de primer estadio, los individuos también se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,145$, $P>0,05$, Figura 5.2.). En cambio, cuando se les presentó el extracto de *C. signaticollis* de segundo y tercer estadio, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron significativamente hacia la zona de la arena donde se encontraba el estímulo ($\chi^2=3,926$ y $13,623$, respectivamente, $P<0,001$, Figura 5.2.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas simultáneamente a estímulos de hospedadores de segundo y tercer estadio, las larvas se orientaron al azar en la arena experimental ($\chi^2=2,723$, $P>0,05$, Figura 5.2.).

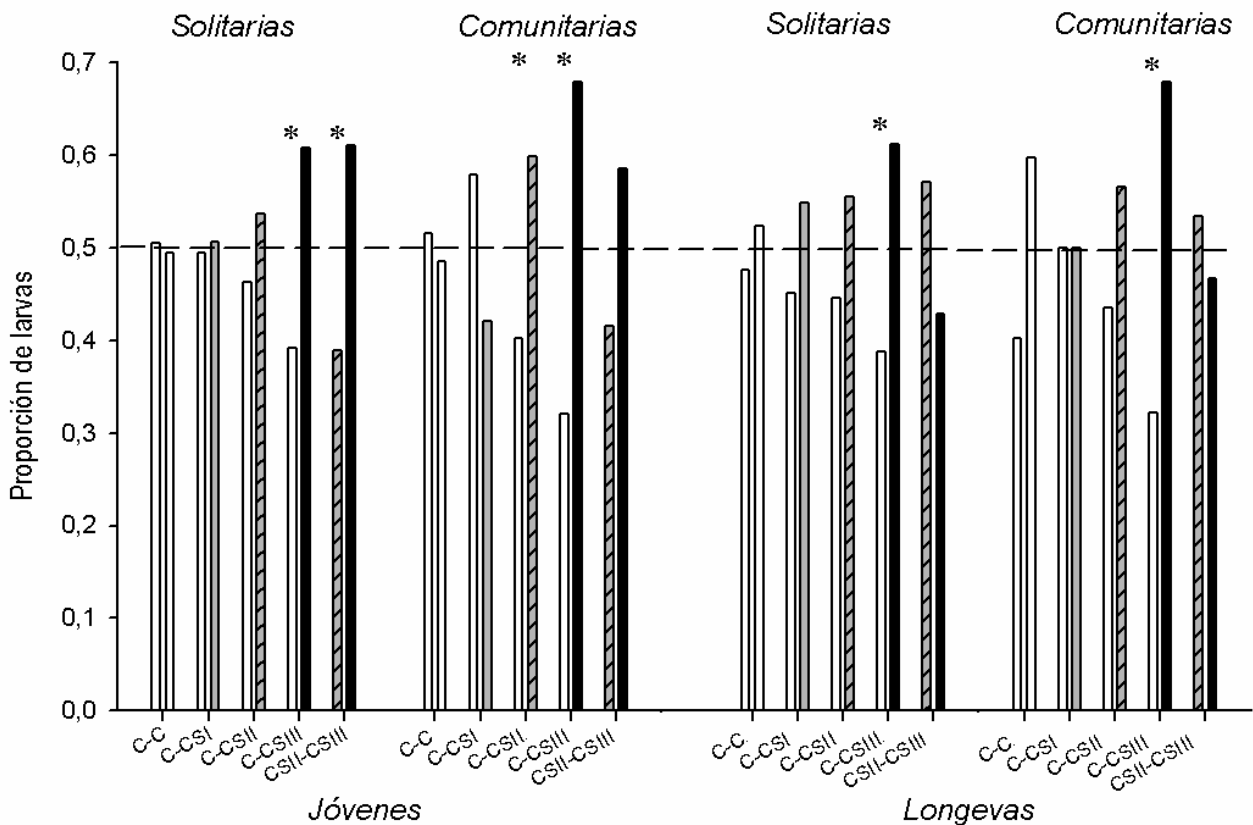


Figura 5.2. Respuesta de orientación de las larvas de *M. ruficauda* de diferente condición a extractos de *C. signaticollis* de diferentes estadios. En todos los casos, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron hacia extractos de *C. signaticollis* de tercer estadio y solamente las larvas “Jóvenes comunitarias” lo hicieron también hacia olores de hospedadores de segundo estadio. Abreviaturas: C, hexano; CSI, extracto de hospedador de primer estadio; CS II, extracto de hospedador de segundo estadio; CSIII, extracto de hospedador de tercer estadio; *: Diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P<0,05$).

Cuando a larvas “Longevas comunitarias” no se les ofreció ningún estímulo (serie C-C), estas se distribuyeron al azar en la arena ($\chi^2=3,322$, $P>0,05$, Figura 5.2.). Luego, cuando a las larvas de *M. ruficauda* se las expuso a olores de *C. signaticollis* de primer y segundo estadio, los individuos también se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,000$ y $1,565$, $P>0,05$, Figura 5.2.). En cambio, cuando se les presentó el extracto de *C. signaticollis* de tercer estadio, las larvas de *M. ruficauda* se orientaron significativamente hacia la zona de la arena donde se se encontraba el estímulo ($\chi^2=10,714$, $P<0,001$, Figura 5.2.). Por último, cuando larvas de *M. ruficauda* fueron expuestas a estímulos de hospedadores de segundo y tercer estadio simultáneamente, las larvas se orientaron al azar en la arena experimental ($\chi^2=0,333$, $P>0,05$, Figura 5.2.).

Aceptación del hospedador

A. Grado de parasitismo

Se encontró que las respuestas de aceptación del hospedador *C. signaticollis* en la larva de *M. ruficauda* fueron diferentes en función del grado de parasitismo que presentaba el hospedador, edad de la larva parasitoide y densidad de competidores coespecíficos.

Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica

En cuanto a las larvas “Jóvenes solitarias” se encontró que el 100% de las larvas parasitoides se aferró a los individuos sanos de tercer estadio de *C. signaticollis*. Por otra parte, cuando se le ofreció a la larva un individuo de tercer estadio de *C. signaticollis* monoparasitado, se encontró que el 38% de los individuos se aferró exitosamente. En cambio, solo el 3% de las larvas parasitoides se aferró al hospedador alternativo *P. bonariensis*. Se encontró que la aceptación del superparasitismo es significativamente menor que la aceptación del hospedador sano ($Q=10,66$, Figura 5.3.). Esta respuesta de aferramiento es específica para *C. signaticollis* ya que se registraron muy pocos casos de aceptación del hospedador alternativo *P. bonariensis*.

Por otro lado, el 97,5% de las larvas “Longevas solitarias” se aferró a individuos sanos de tercer estadio de *C. signaticollis*. En cambio cuando a la larva se le ofreció un hospedador monoparasitado, se encontró que se aferró el 8,3% de las larvas parasitoides. Finalmente, el 9,3% de los parasitoides se aferró al hospedador alternativo *P. bonariensis* (Figura 5.3.). Se encontró que la aceptación del superparasitismo es significativamente menor que la aceptación del hospedador sano ($Q=13,08$, Figura 5.3.).

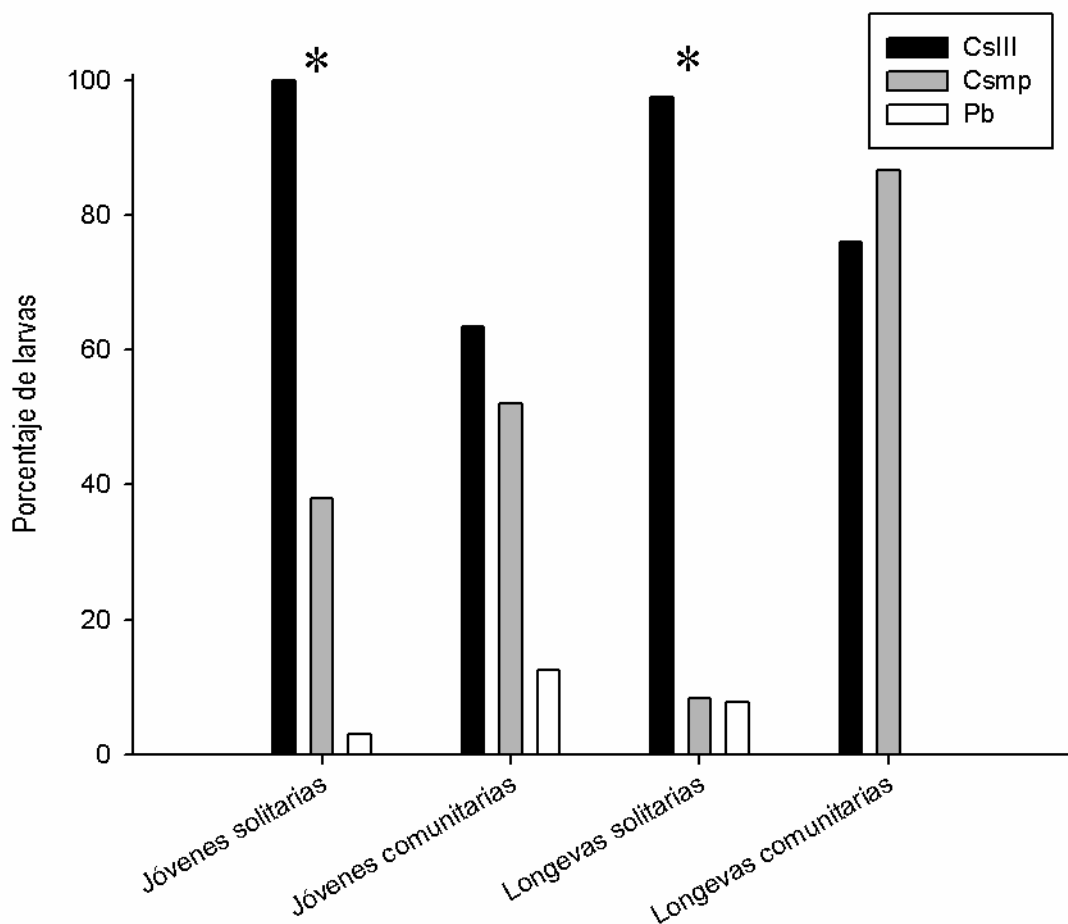


Figura 5.3. Aceptación del hospedador en larvas de *M. ruficauda* de diferente condición a larvas de *C. signaticollis* de diferente grado de parasitismo. En todos los casos, las larvas de *M. ruficauda* aceptaron en mayor porcentaje a los hospedadores sanos, salvo las larvas “Jóvenes comunitarias” que aceptaron por igual a hospedadores sanos y monoparasitados. En ninguno de los casos hubo aceptación del hospedador alternativo *P. bonariensis*. Abreviaturas: Cs III, hospedadores de la especie *C. signaticollis* sanos; Csmp, hospedadores de la especie *C. signaticollis* monoparasitados; Pb, hospedadores de la especie *P. bonariensis*; *: Diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P<0,05$).

Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos

En cuanto a las larvas “Jóvenes comunitarias” se encontró que el 63,64% de las larvas parasitoides se aferró a un individuo sano de tercer estadio de *C. signaticollis*. Por otra parte, el 52% de ellas se aferró a un individuo monoparasitado de tercer estadio de *C. signaticollis*. Solo el 12,5% de las larvas parasitoides se aferró a hospedadores *P. bonariensis* (Figura 5.3.). En este caso, no se encontraron diferencias entre el grado de aceptación de hospedadores sanos y monoparasitados ($Q=1,43$, Figura 5.3.). Nuevamente la respuesta es específica para el hospedador *C. signaticollis* ya que la aceptación de *P. bonariensis* fue muy baja.

Por otro lado, el 76% de las larvas “Longevas comunitarias” se aferró a un individuo sano de tercer estadio de *C. signaticollis*. En cuanto a los hospedadores monoparasitados, se encontró que el aferramiento fue del 86,8%. Finalmente, el 0% de los parasitoides se aferraron a hospedadores de *P. bonariensis*. En este caso, no se encontró diferencia entre la aceptación del parasitismo de hospedadores sanos y monoparasitados ($Q=3,30$, Figura 5.3.).

B. Estadio del hospedador

Se encontró que las respuestas de aceptación del hospedador *C. signaticollis* de la larva de *M. ruficauda* fueron diferentes en función del estadio del hospedador, edad de la larva parasitoide y densidad de competidores coespecíficos.

Respuesta de las larvas en ausencia de competencia intraespecífica

En cuanto a las larvas “Jóvenes solitarias” se encontró que el 100% de las larvas parasitoides se aferró a los individuos sanos de tercer estadio de *C. signaticollis*. Por otra parte, cuando se le ofreció a la larva un individuo de segundo estadio de *C. signaticollis*, se encontró que se aferró exitosamente el 66,7% de los individuos. Nuevamente, se encontró que las larvas jóvenes y solitarias prefieren parasitar hospedadores de menor calidad ($Q=8,62$, Figura 5.4.).

Por otro lado, el 97,5% de las larvas “Longevas solitarias” se aferró a individuos sanos de tercer estadio de *C. signaticollis*. En cambio cuando a la larva se le ofreció un hospedador de segundo estadio, se encontró que el aferramiento fue del 38,9%. En este caso, las larvas prefirieron a los hospedadores de segundo estadio ($Q=3,32$, Figura 5.4.).

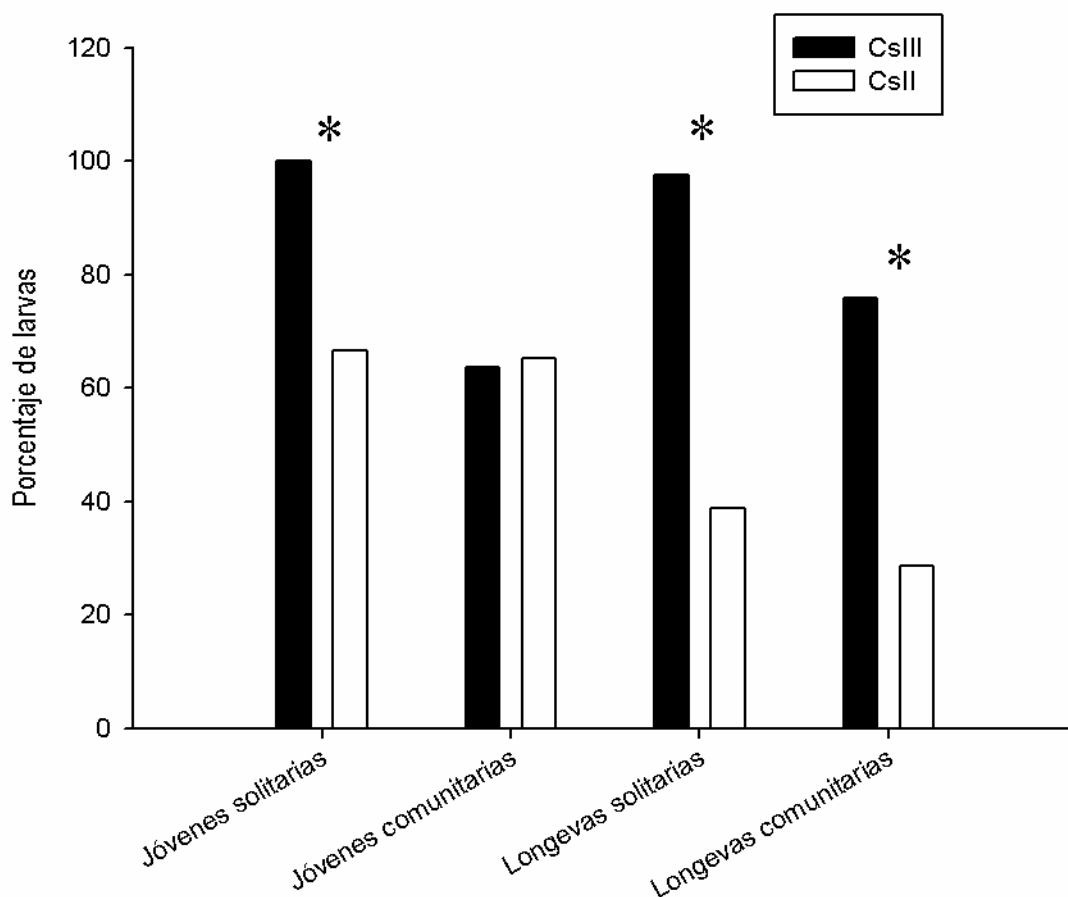


Figura 5.4. Aceptación del hospedador en larvas de *M. ruficauda* de diferente condición hacia larvas de *C. signaticollis* de diferente estadio. En todos los casos, las larvas de *M. ruficauda* aceptaron en mayor porcentaje a los hospedadores de tercer estadio, salvo las larvas “Jóvenes comunitarias” que aceptaron por igual a hospedadores de segundo y tercer estadio. Abreviaturas: Cs III, hospedadores de tercer estadio; CsII, hospedadores de segundo estadio; *: Diferencias estadísticamente significativas (χ^2 , $P<0,05$).

Respuesta de las larvas en presencia de competidores intraespecíficos

En el caso de las larvas “Jóvenes comunitarias” se encontró que el 65,3% se aferró a un individuo sano de tercer estadio de *C. signaticollis*. Por otra parte, el 63,6% se aferró a un individuo sano de segundo estadio de *C. signaticollis* (Figura 5.4.). En este experimento se encontró que el

porcentaje de parasitismo de hospedadores sanos y óptimos fue similar al porcentaje de parasitismo de hospedadores de segundo estadio, y que ambos fueron bajos (Q=1,22, Figura 5.4.).

Por otro lado, el 76% de las larvas “Longevas comunitarias” se aferró a un individuo sano de tercer estadio de *C. signaticollis*. En cuanto a los hospedadores de segundo estadio, se encontró que el aferramiento fue del 28,6% (Figura 5.4.). Finalmente, en este experimento se encontró que las larvas longevas criadas en un ambiente de alta densidad de coespecíficos prefieren parasitar hospedadores de segundo estadio (Q=2,63, Figura 5.4.).

Discusión

En este Capítulo se investigó el efecto de los factores externos e internos en la orientación y aceptación del hospedador en la larva de *M. ruficauda*. Particularmente se estudió el efecto de la densidad de competidores y de la edad (factor externo e interno, respectivamente) sobre estos comportamientos. Se encontró que tanto la densidad de competidores coespecíficos como la edad de la larva que forrajea modifican el comportamiento de búsqueda y aceptación del hospedador. Esta situación provoca un cambio en la respuesta en función del estado, donde el parasitoide extiende sus oportunidades de parasitismo ampliando el rango de hospedadores potenciales hacia los no óptimos. El resultado de esta estrategia es que las larvas criadas en forma gregaria (competencia) y jóvenes se orientan y aceptan parasitar hospedadores sub-óptimos, los cuales son rechazados habitualmente cuando la larva parasitoide se cría de manera solitaria. Por otro lado, las larvas jóvenes criadas en condiciones de alta densidad de coespecíficos se orientan tanto a olores de hospedadores sanos como monoparasitados. A su vez, las larvas de *M. ruficauda* en esas condiciones se orientan hacia olores de hospedadores de segundo estadio, hecho que no se encontró para las larvas parasitoides criadas de manera solitaria. Respuestas similares se encontraron para la aceptación del parasitismo, donde las larvas jóvenes criadas en condición de competencia aceptan en mayor medida parasitar hospedadores previamente parasitados, así como también a larvas de segundo estadio de *C. signaticollis*.

Los resultados que se muestran en este Capítulo resaltan la importancia de cómo las condiciones externas e internas pueden influir sobre el comportamiento de los insectos en general. Se han estudiado los efectos de los factores internos sobre las estrategias de búsqueda y se ha visto que los ritmos biológicos, el tamaño del cuerpo, la edad y el parasitismo están entre los factores más influyentes. Los ritmos biológicos son muy importantes ya que sincronizan muchos de los comportamientos de los insectos. Por ejemplo, son responsables de sincronizar el canto de hembras o la respuesta de machos a feromonas (Cardé y Bell 1995). Se ha visto que las cucarachas alemanas *Blattella germanica* L. (Blatodea: Blattellidae) responden a las feromonas sexuales durante la escotofase pero no en la fotofase (Bell et al. 1978). Por otro lado, las vinchucas poseen un patrón de actividad bimodal coincidente con el comienzo de la escotofase y el final de la fotofase, permaneciendo en akinesis el resto del día (Lazzari 2009). Es decir, que la influencia de los ritmos biológicos en el comportamiento de los insectos puede ser importante y se debe tener en cuenta al realizar estudios experimentales. En el caso de *M. ruficauda*, las larvas viven dentro del suelo donde el sol no penetra, por lo tanto, la luz no puede servir como zeitgeber o sincronizador del reloj interno. Es probable que las larvas de este parasitoide utilicen otras variables para estimar el momento del día, como puede ser la variación diaria de temperatura. Sin embargo, como no se tiene información al respecto en esta especie, los experimentos fueron realizados durante el día ya que se sabe que al menos el adulto es de hábitos diurnos, y se presume que la larva desarrolla todos sus comportamientos de forrajeo en la franja diaria de luz.

Otro de los factores internos que influye sobre el comportamiento es el tamaño corporal. Se ha visto que los individuos de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) poseen gran variabilidad en su tamaño pupal, siendo la longitud normal de 14 a 26 mm. En experimentos de túneles de viento se ha visto que los machos más grandes se desempeñan mejor en cuanto al vuelo. De estos estudios se dedujo que en esta especie los machos de mayor tamaño podrían alcanzar a las hembras más rápidamente que los más pequeños (Kuenen y Cardé 1993). Para el caso de *M. ruficauda* el tamaño del hospedador que parasitan es de suma importancia ya que las larvas parasitoides se alimentan de su cuerpo. Un hospedador pequeño proveerá menos recursos a las larvas parasitoides que uno grande y es por esto que el peso del hospedador es una variable asociada positivamente con el grado de parasitismo, más aún porque se trata de un parasitoide solitario. En los

parasitoides, la cantidad de alimento adquirido del hospedador durante la vida larvaria es decisiva, ya que es la energía necesaria para realizar la metamorfosis y alcanzar la adultez. A su vez, las reservas obtenidas durante la etapa larvaria (tenerales) serán las únicas con la que contará el adulto hasta que comience a alimentarse. De esta manera, hospedadores pequeños restringirían el grado de uso que puede efectuar una larva de *M. ruficauda*. Una vez que alcanza el estado adulto, *M. ruficauda* se comporta como un voraz depredador de insectos. Este hecho indica que el adulto debe incorporar energía de la dieta consumiendo insectos que no la puede obtener siendo una larva. Sin embargo, a diferencia de la larva que solo requiere de un hospedador para completar su desarrollo, los adultos requieren de muchas presas, más aún por tener una estrategia de oviposición sinovigénica (Nussenbaum 2007). Por lo tanto, la disponibilidad de alimento durante la etapa larval se convierte en un factor determinante en el desarrollo del tamaño corporal del adulto.

Los parásitos que portan los insectos también se pueden considerar como factores internos que tienen una cierta influencia sobre el comportamiento de sus hospedadores ya que pueden modificar varios patrones como la locomoción, alimentación y hasta el desplazamiento (Cardé y Bell 1995). Se ha observado que cuando *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) está infectado con el cestode *Hymenolepis diminuta* Rudolphi tienen una disminución en la respuesta hacia la feromona sexual de las hembras (Hurd y Parry 1991). Por otro lado, se ha visto que el comportamiento sexual de la cucaracha *Periplaneta americana* L. (Blatodea: Blattidae) es afectado por el parásito acantocéfalo *Moniliformis moniliformis* Bemser (Carmichael et al. 1993). Las larvas de *M. ruficauda* se ha observado que en ocasiones evitan parasitar sistemáticamente a algunos hospedadores. Un seguimiento prolongado de estos hospedadores reveló que se encontraban parasitados por individuos de alguna especie de la familia Tachinidae (Diptera). Esta observación sugiere que cuando los hospedadores se encuentran parasitados por otra especie los parásitos modifican al hospedador de tal manera que las larvas de *M. ruficauda* lo evitan. También se ha observado que los gusanos blancos pueden estar parasitados con una especie de Nematoda, pero aun no se han realizado estudios al respecto. Por último, estos hechos podrían indicar que las larvas de *M. ruficauda* tendrían la capacidad de detectar a hospedadores parasitados por individuos de otras especies (discriminación interespecífica) además de la discriminación intraespecífica como se mostró en el Capítulo 4.

En esta Tesis se estudió la influencia del parasitismo por coespecíficos sobre la orientación al hospedador. Se encontró que la orientación hacia olores de hospedadores monoparasitados se modifica con la edad de las larvas parasitoides. Particularmente, se encontró que cuando el olor ofrecido era de hospedadores monoparasitados todas las larvas los evitaron, con excepción de las jóvenes criadas en alta densidad de coespecíficos. Sin embargo, las larvas longevas, se orientaron indistintamente hacia hospedadores de cualquier calidad cuando se les ofreció olor de hospedador monoparasitado y sano. En la siguiente sección, se estudió la influencia del estadio sobre la orientación al hospedador. Del mismo modo, la orientación hacia el hospedador depende de factores externos e internos como la edad y la densidad de coespecíficos.

La edad de los individuos es considerado un factor interno muy importante y que tiene mucha influencia sobre el comportamiento de los insectos. Por ejemplo, se ha visto que en la polilla *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera: Tortricidae) los machos cambian la periodicidad de su vuelo a medida que envejecen. Se vio que los machos modifican su patrón de vuelo de manera tal que realizan más temprano la búsqueda de la hembra. Este cambio en el comportamiento provoca que los machos más longevos aumenten la probabilidad de encontrar a una hembra disminuyendo así el número de hembras vírgenes disponibles para los machos más jóvenes. En el caso de *M. ruficauda*, la edad fue uno de los factores que se estudió en los experimentos. Se encontró que la orientación de las larvas es se modifica con la edad. Las larvas longevas no se orientaron a olores de hospedadores de segundo estadio y no lograron discriminar su calidad cuando se les ofreció olor de hospedadores de segundo y tercer estadio simultáneamente. De esta manera, la edad de las larvas modifica la orientación de *M. ruficauda* de manera que las larvas longevas son atraídas hacia ambos olores de similar manera. Esto podría indicar que la edad modifica su capacidad de discriminación del olor o que sufren alguna clase de deterioro fisiológico que genera la falta de orientación.

Finalmente, existen otros factores internos capaces de modificar el comportamiento de las larvas parasitoides. Por un lado, dado que las larvas de este parasitoide tienen una alta supervivencia durante el estadio que busca (se discutirá en el Capítulo 7), existe la posibilidad de que puedan encontrar más de un hospedador en su vida. Debido a esto, la experiencia previa en el contacto con

hospedadores podría jugar un papel importante en las decisiones que toman las larvas. En este contexto, sería interesante estudiar si las larvas de *M. ruficauda* tienen la capacidad de aprender a asociar a los olores de los diferentes hospedadores con su disponibilidad en el tiempo, luego de ser expuestos a dichas claves en repetidas ocasiones durante su fase de búsqueda. Este aspecto sería adaptativo para la especie, debido a que de este modo las larvas, mediante la discriminación y el aprendizaje, podrían incrementar la probabilidad de encontrar hospedadores óptimos.

Los factores externos son aquellos que pueden modular las estrategias de búsqueda, tales como duración del día o la temperatura. Otros factores bióticos, como la presencia de otros individuos, también son factores externos y puede que también influyan en estos comportamientos. En cuanto a la influencia de la duración del día, específicamente a la incidencia de la radiación solar, se cree que no tendría importancia en la larva de *M. ruficauda*, ya que la búsqueda y el parasitismo del hospedador ocurren dentro del suelo en oscuridad total. En cuanto a los cambios de temperatura, se sabe que tienen influencia positiva en los insectos, influyendo de manera directa sobre la búsqueda del hospedador (Chapman 1998). Es por este motivo que en esta Tesis no se estudió este aspecto y todos los experimentos fueron realizados bajo temperatura controlada y dentro del rango óptimo de actividad de la mayoría de los insectos (Chapman 1998). Por otra parte, la humedad es otro factor que tiene influencia en los comportamientos ya que afecta el estado hídrico de los insectos. En el caso de *M. ruficauda* este factor resulta de significativa importancia, ya que la larva por su minúsculo tamaño es muy sensible a la humedad y muere instantáneamente al experimentar una humedad relativa por debajo del 45% (Castelo, observación personal). Por tal motivo, no tiene sentido realizar estudios de la influencia de este factor sobre el comportamiento de búsqueda, y en todos los experimentos realizados en esta Tesis se mantuvo la humedad a saturación ya que, como se explicó en el Capítulo 2, las larvas de *M. ruficauda* son muy sensibles a la desecación.

En cuanto a la densidad de coespecíficos, existen estrategias que toman los insectos en función de la densidad poblacional. Por ejemplo, en *C. fumiferana*, cuando la densidad poblacional de individuos es baja, los machos localizan a las hembras aparentemente mediante una orientación en contra del viento siguiendo una pluma de olor (Seabrook et al. 1989). Cuando la densidad de individuos es alta, las estrategias de búsqueda cambian, como por ejemplo en *L. dispar*, donde los

machos localizan a las hembras simplemente caminando alrededor del árbol donde se encuentran (Cardé y Hagaman 1984). En *M. ruficauda* la densidad de coespecíficos mostró ser un factor con una alta influencia sobre la orientación y aceptación del hospedador. Encontramos que las larvas criadas en una situación de alta competencia, se orientan y se aferran a hospedadores sub-óptimos como son hospedadores de estadio II o monoparasitados. Esto significa que la larva tiene la capacidad de detectar, probablemente de forma mecánica, la presencia de coespecíficos que compiten por el mismo recurso y de modificar su comportamiento de tal manera de bajar su umbral de selectividad.

En este Capítulo se ha visto como influyen los factores internos y externos en la búsqueda y aceptación del hospedador en la larva de *M. ruficauda*. Se pudo determinar que la edad (factor interno) y la densidad de coespecíficos (factor externo) interaccionan modulando la orientación y aceptación del hospedador. Como se vio en la Introducción general, *M. ruficauda* es una especie de parasitoide solitario pero es común encontrar hospedadores superparasitados. En el Capítulo 4 se encontró que esta especie posee la capacidad de discriminar el estado de parasitismo de su hospedador mediante claves químicas y que solamente se orienta hacia sus olores cuando el parasitoide se crió en condiciones de alta densidad de coespecíficos. Luego, en este Capítulo se encontró que la discriminación también es hacia los distintos estadios de su hospedador, pero en condiciones de alta competencia las larvas parasitoides deciden orientarse hacia olores de hospedadores sub-óptimos. Este comportamiento también se encontró para la aceptación de los hospedadores donde las larvas jóvenes criadas con una alta densidad de coespecíficos aceptaron en mayor porcentaje hospedadores sub-óptimos que las larvas criadas solitariamente. El conjunto de resultados pareciera indicar que el superparasitismo en el campo se produce no porque las larvas de *M. ruficauda* sean incapaces de discriminar al hospedador sino porque bajo un escenario donde la competencia por el hospedador es alta, la aceptación del superparasitismo sería para algunas larvas la única manera de acceder a algún hospedador aunque sea sub-óptimo. Esta estrategia le permitiría a las larvas parasitoides incrementar su fitness ya que de no lograr parasitar al hospedador mueren durante el segundo estadio. Una observación singular al respecto se dio al realizar el parasitismo artificial de los hospedadores de segundo estadio. Se encontró que la larva parasitoide se aferraba principalmente entre el tórax y el abdomen del hospedador. El hospedador luego continúa su desarrollo y muda al tercer estadio, y se observó que la larva parasitoide se desprendía durante la

muda y luego se posicionaba en la pata III derecha o izquierda (Castelo, observación personal). Aparentemente esta posición le aseguraría acceso preferencial a los tejidos del hospedador. Paralelamente se observó que en los hospedadores ya parasitados provenientes del campo, las larvas parasitoides se encuentran frecuentemente parasitando a las larvas III de *C. signaticollis* en la pata III como lo observado en el laboratorio. A pesar de no haberse realizado experimentos particulares para estudiar este fenómeno, todo indicaría que las larvas de *M. ruficauda* podrían hacer uso del hospedador aún cuando este no se encuentra totalmente desarrollado, como respuesta a cambios en la densidad de competidores. Se presume que con esta estrategia el parasitoide que encuentra un hospedador sub-óptimo hace uso del mismo asegurándose de que otra larva no llegue primero y gane el acceso privilegiado a los recursos del hospedador.

Si bien existe una variedad de hospedadores sub-óptimos para *M. ruficauda*, para los experimentos realizados en este Capítulo solo se utilizó a la especie *C. signaticollis*, por ser la especie hacia la cual *M. ruficauda* mostró mayor especificidad (Castelo 2003, Castelo y Corley 2010) y en la que se produce en mayor grado el superparasitismo (Castelo, datos no publicados). Sin embargo, cabe destacar que existen otras especies de gusanos blancos en el área de acción geográfica de *M. ruficauda* que pueden ser hospedadores potenciales. Castelo y Corley (2010) estudiaron el parasitismo a campo y encontraron que el 86,6% de los hospedadores parasitados pertenecían a *C. signaticollis*. El 13,4% restante del parasitismo se debió a las otras especies de gusanos blancos, y más precisamente el 6,6% correspondió a la especie *C. modesta*. Estos resultados muestran que a pesar de ser bajo, el parasitismo de hospedadores sub-óptimos de otras especies también puede ocurrir en ocasiones. Barrantes (2009) estudió la orientación y aceptación de las larvas de *M. ruficauda* hacia hospedadores sub-óptimos del género *Cyclocephala* en función de la edad de la larva. En ese trabajo, encontró que larvas longevas se orientan activamente hacia olores de *C. modesta* y también que aceptan parasitar a *C. putrida*. Estos resultados muestran que *M. ruficauda* tiene la capacidad de orientarse y aceptar el parasitismo de hospedadores de otras especies que resultan ser subóptimos, en función de su estado interno y de las restricciones que impone el ambiente. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender este proceso.

Finalmente, en este Capítulo se describieron las estrategias de parasitismo utilizadas por la larva de *M. ruficauda* y como los factores internos y externos pueden influir sobre este proceso. El superparasitismo podría ser una estrategia ventajosa en condiciones donde la competencia es muy alta. Además, cabe destacar que las hembras de *M. ruficauda* comienzan a oviponer cuando el estadio III de *C. signaticollis* no se encuentra disponible, hecho que podría explicarse porque las larvas parasitoides pueden, cuando el ambiente es desfavorable, utilizar hospedadores no desarrollados de manera de obtener recursos y esperar al hospedador adecuado. Otra posibilidad es que al parasitar estadios inferiores del hospedador, la larva parasitoide se asegura el acceso a un hospedador aunque sea de baja calidad y de esa manera tendría mayores probabilidades de ganar la competencia, por acceder a los recursos mucho antes que otras larvas lo colonicen. Además, estos resultados podrían estar indicando que las hembras de *M. ruficauda* pueden detectar al hospedador en sus estadios inmaduros al momento de buscar sitios de oviposición propicios. En conclusión, en este trabajo se ha encontrado que *M. ruficauda* cuenta con varias estrategias que utiliza durante la búsqueda y posterior parasitismo del hospedador. El conjunto de estas estrategias le confieren a este parasitoide una diversidad de armas con las cuales incrementar las probabilidades de realizar el parasitismo exitoso y completar el desarrollo.

CAPÍTULO 6

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LA ORIENTACIÓN AL HOSPEDADOR EN *Mallophora ruficauda*

Introducción

Las variables meteorológicas del hábitat ejercen influencia sobre la vida y los comportamientos de los animales (Begon 2006). Particularmente, las variables con mayor incidencia son la radiación solar, la temperatura, la humedad, las precipitaciones, la presión barométrica y los vientos. Especialmente tienen mucha importancia los valores medios y extremos que éstas toman, y sus regímenes de variación. Estas variables definen lo que se conoce como “estado del tiempo” de la atmósfera en un lugar y tiempo determinado.

El estado del tiempo es un factor complejo que incluye varias variables ambientales y que tiene una gran influencia en el comportamiento de los insectos. Esto es porque se ha visto que un desmejoramiento en las condiciones del estado del tiempo interrumpe o modifica determinadas actividades vitales. Particularmente para los sistemas parasitoide-hospedador se han realizado diversos estudios. Uno de los comportamientos más estudiados respecto de la influencia que tienen los factores abióticos es el comportamiento de búsqueda del hospedador por parte de la hembra (Casas 1989, Keller 1990, Roitberg et al. 1992, Steinberg et al. 1992, Roitberg et al. 1993, Fink y Volkl 1995, Bourchier y Smith 1996, Messing et al. 1997, Wang et al. 1997, Weisser et al. 1997). Marchand y Mcneill (2000) estudiaron el efecto de las condiciones ambientales sobre el comportamiento de búsqueda de pareja en *Aphidius nigripes* Ashmead (Hymenoptera: Aphidiidae) y encontraron que existe un compromiso entre la velocidad del viento que transporta la feromona de atracción y la capacidad de vuelo de los machos. Por otra parte, también se ha reportado para otro parasitoide que existe un efecto de la disminución de la presión barométrica sobre el comportamiento de localización y de permanencia en un parche de hospedadores (Roitberg et al. 1993). La razón por la cual una disminución en la presión atmosférica tiene efecto sobre los comportamientos de la iniciación del vuelo o de permanencia en un parche en estos insectos radica en que el deterioro en el estado del tiempo es una señal importante del advenimiento de una tormenta y de un incremento en el riesgo de muerte (Amat et al. 2006).

Variaciones de la presión atmosférica

La presión atmosférica es la fuerza ejercida por el aire en cualquier punto de la atmósfera. La presión atmosférica normal es de 1 atmósfera, que es el equivalente a 1.013,3 hectopascales o 760 milímetros de mercurio. La presión atmosférica en un mismo lugar no es constante, sino que experimenta continuas variaciones que son de pequeña magnitud en la mayor parte del planeta, salvo en Islandia y Siberia (Villodas 2008). La sucesión de los días y las noches provoca, alternativamente, calentamiento y enfriamiento de la atmósfera, lo cual a su vez genera oscilaciones rítmicas de expansión y contracción de la atmósfera que se traducen en oscilaciones de presión. Estas variaciones no parecen sujetas a ninguna ley, pero un estudio cuidadoso de las mismas ha demostrado que existen variaciones regulares e irregulares que se superponen (Villodas 2008).

Las variaciones regulares se caracterizan por tener poca amplitud y aparecer únicamente con claridad durante los periodos de buen tiempo. Existen dos variaciones que tienen diferente duración: una es anual y la otra diurna. La variación anual es en proporción más lenta y alcanza tres o cuatro milímetros de mercurio de amplitud. El máximo ocurre en invierno (julio) y el mínimo durante el verano (enero) y la variación es mayor en las altas latitudes. En cuanto a la variación diurna se cree que la atmósfera posee un período natural propio de oscilaciones de 12 horas aproximadamente, es decir una doble oscilación en 24 horas. Estas oscilaciones se encuentran estimuladas por las variaciones de temperatura, y como resultado se produce una doble marca atmosférica que se propaga alrededor de la tierra siguiendo la posición del sol. Las presiones máximas se observan en los trópicos aproximadamente a las 10 y a las 22 hs hora local, mientras que las mínimas se producen aproximadamente a las 4 y a las 16 hs hora local. Al registrar la presión diaria con un barómetro se pueden observar aumentos en la presión atmosférica entre las 4 y las 10 y entre las 16 y las 22 horas, mientras que se registran disminuciones entre las 10 y las 16 horas y entre las 22 y las 4 de la madrugada. Esta oscilación en ausencia de perturbaciones se conoce con el nombre de "marea barométrica" o variación semidiurna de presión (Simidchiev 1996). En las regiones templadas el fenómeno es menos evidente y posee una menor amplitud, registrándose una variación máxima de aproximadamente 1 milímetro de mercurio (= 1,33 hPa).

Las variaciones irregulares o accidentales son mucho más considerables, pudiendo alcanzar más de 10 milímetros de mercurio en 24 horas. Por eso al superponerse a las anteriores que son de amplitud pequeña, prácticamente las anulan. Estas variaciones accidentales se relacionan con el estado general del tiempo en tal forma que el descenso barométrico suele acompañar al mal tiempo y la subida anuncia la vuelta del buen tiempo. En general, condiciones de alta presión se corresponden con buen tiempo, suaves vientos y temperaturas relativamente bajas. Por otro lado, las bajas presiones se relacionan con el tiempo cálido, nublado, lluvias y vientos fuertes. Las variaciones de las masas de aire de un lugar son consecuencia del pasaje frecuente de centros de altas y bajas presiones. Las variaciones semidiurnas de presión son un fenómeno bastante complejo. Las oscilaciones no son completamente simétricas y varían considerablemente de un lugar a otro. Aunque tienen poca influencia sobre otros factores meteorológicos, es necesario tenerlas en cuenta cuando se interpretan variaciones de presión (Simidchiev 1996). Las zonas donde se producen las mayores variaciones irregulares de presión son las regiones tropicales, en cambio en las latitudes medias y altas es más difícil detectar estas variaciones semidiurnas de presión (Villodas 2008). Una disminución de la presión que supere aproximadamente 1 hPa en un lapso de 2 horas es indicativa de que se acerca una tormenta. Se acepta generalmente que una variación con mayor pendiente es más intensa e indica que se producirá una tormenta más fuerte. Por el contrario, una subida de la presión, indica buen tiempo (Villodas 2008).

Como se mencionó más arriba, los cambios en los factores abióticos influyen en los comportamientos de los insectos. La teoría dice que en los insectos de pequeño tamaño pueden experimentar cambios comportamentales en respuesta a cambios bruscos en las condiciones climáticas, los cuales estarían asociados a evitar la muerte durante el forrajeo y que resultan adaptativos. En el caso de los parasitoides, muchos comportamientos relacionados con el éxito de parasitismo como la búsqueda de alimento, de pareja o de hospedadores está influenciada por los cambios en la presión ambiental. En descenso brusco en la presión barométrica podría indicar un elevado riesgo de muerte durante el forrajeo para estos pequeños insectos. Es por esto que se presume que contar con mecanismos de detección de los cambios en la presión barométrica, tales como la estimación de la tasa de cambio en este parámetro, sería una estrategia adaptativa. En el caso de *M. ruficauda* las larvas de segundo estadio son las que realizan la búsqueda del hospedador. En

capítulos anteriores se encontró que las larvas de *M. ruficauda* tienen la capacidad de utilizar señales externas, tal como la densidad de coespecíficos, y de modificar su comportamiento de búsqueda del hospedador. En este Capítulo se estudió el efecto del cambio negativo en la presión barométrica sobre la búsqueda del hospedador en *M. ruficauda*. Se espera que la búsqueda del hospedador se vea interrumpida cuando el descenso de la presión barométrica supere la tasa de cambio de las variaciones normales diarias.

Materiales y Métodos

Insectos

En este capítulo de la Tesis se realizaron experimentos de olfatometría. Se utilizaron como individuos experimentales a larvas de estadio II de *M. ruficauda* provenientes de desoves recolectados a campo y que fueron mantenidas en el laboratorio luego de su nacimiento. Como estímulo del hospedador se utilizaron extractos de gusanos blancos de la especie *C. signaticollis*. Los detalles metodológicos de los experimentos y la forma de obtención de los insectos se detallan en el Capítulo 2.

Influencia de la presión barométrica en la orientación hacia el hospedador

Los experimentos se realizaron de igual manera que los controles CS-C del Capítulo 5. Se realizó una serie control y una serie experimental con extracto del hospedador utilizando el dispositivo experimental olfatómetro “extractos-larvas” descrito en el Capítulo 2. Se estudió la orientación de las larvas de *M. ruficauda* hacia olores del hospedador sano *C. signaticollis*.

Paralelamente a la realización del experimento clásico de olfatometría, se registró la presión barométrica al inicio y al final del experimento. Luego, se calculó la variación de presión experimentada por la larva que forrajea, cuantificando la diferencia entre estas dos medidas y dividiéndola por el tiempo de experimentación. De esta manera se obtuvo la tasa de cambio de la

presión durante el experimento. Una vez realizados todos los ensayos, las series experimentales fueron clasificadas en dos grupos en función de la variación de presión experimentada por los individuos y de la variación de presión normal dada para el período de experimentación (variaciones semidiurnas de la presión barométrica, ver Introducción de este Capítulo). Cuando la diferencia de presión entre el inicio y el final del ensayo fue negativa y mayor que la esperada por las variaciones normales, es decir que la presión final era menor que la inicial, se incluyó al experimento en el grupo “Diferencia negativa de presión”, mientras que si la diferencia de presión era positiva y/o estaba dentro de las variaciones normales o se lo incluyó dentro del grupo “Control” (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Tratamientos realizados para evaluar la influencia de la variación en la presión atmosférica sobre el comportamiento de localización del hospedador en *M. ruficauda*.

Tratamiento	N	Descripción
Control	410	Experimentos donde la diferencia de presión entre el inicio y final del ensayo fue positiva o hubo una variación normal.
Diferencia negativa de presión	313	Experimentos donde la diferencia de presión entre el inicio y final del ensayo fue negativa y mayor a la variación normal.

Análisis estadístico

Se analizó la preferencia de las larvas de *M. ruficauda* por cualquiera de los extremos de la arena experimental contra una distribución al azar mediante Pruebas de bondad de ajuste de χ^2 (Zar 1996). Como la variación normal de la presión atmosférica durante el período de experimentación es de aproximadamente 2 hPa en cuatro horas, se consideró un cambio de 1hPa en 90' como el umbral en la magnitud de descenso de presión que podría afectar el comportamiento de forrajeo de los insectos. Entonces, para realizar el análisis, las series experimentales fueron divididas en dos grupos siguiendo este criterio.

Resultados

Se encontró que las respuestas de orientación de *M. ruficauda* hacia olores de *C. signaticollis* son dependientes de las condiciones ambientales, particularmente a las variaciones de la presión atmosférica.

Cuando la presión barométrica se mantuvo estable, en ascenso o experimentó un descenso menor a 1 hPa durante el período de experimentación, las larvas de segundo estadio expuestas a olores de *C. signaticollis* sanos se orientaron en mayor grado hacia la zona de la arena con el estímulo del hospedador ($\chi^2=16,4$, $P<0,001$, Figura 6.1.). En cambio, cuando el descenso de la presión barométrica superó 1 hPa durante el experimento, las larvas no mostraron una respuesta de orientación y se distribuyeron al azar en la arena experimental ($\chi^2=1,69$, $P>0,05$, Figura 6.1.).

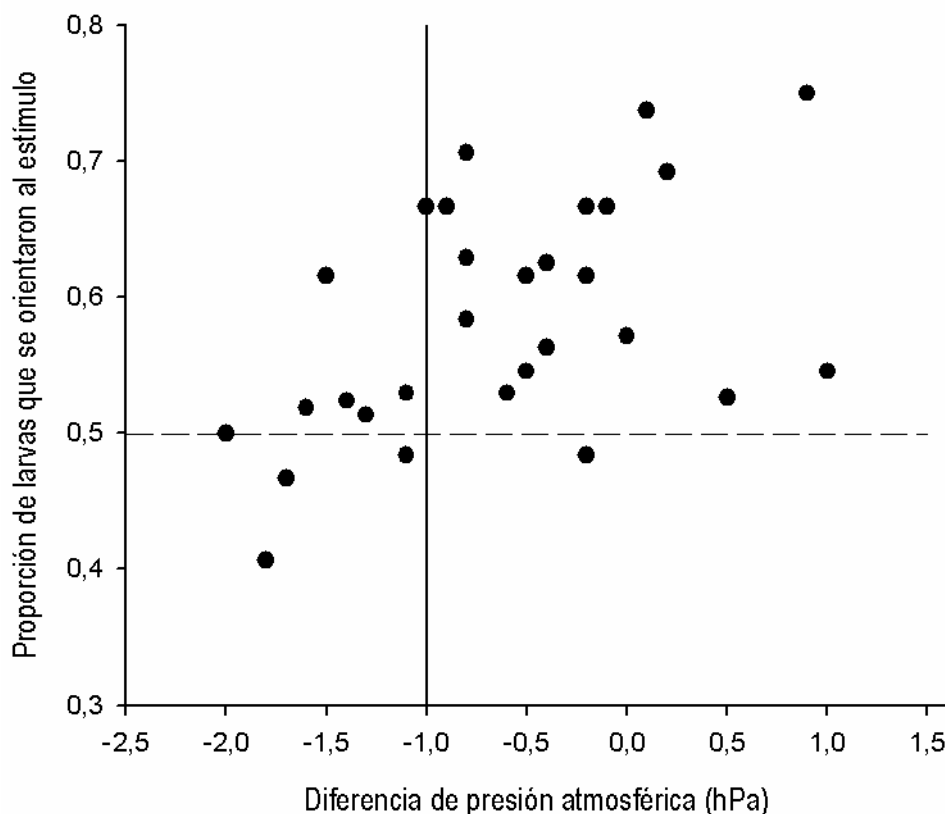


Figura 6.1. Orientación de larvas de *M. ruficauda* hacia extractos del hospedador en función de la variación de la presión atmosférica. Se observa que un descenso brusco en la presión durante la búsqueda del hospedador resulta en la interrupción de la actividad de forrajeo (valores de $\Delta P < -1,0$ hPa).

Discusión

En este Capítulo se estudió el efecto de la presión barométrica sobre el comportamiento de orientación hacia el hospedador en la larva de *M. ruficauda*. Se encontró que un descenso mayor a 1 hPa durante el proceso de búsqueda del hospedador provoca una disminución en la actividad de forrajeo y tiene una importante influencia sobre este comportamiento, ya que las larvas dejan de orientarse hacia los olores del hospedador.

La influencia de la presión barométrica y principalmente de su variación, y la influencia de este cambio en la modulación del comportamiento en insectos han sido muy estudiadas, debido a que es una variable utilizada como indicadora de alto riesgo de mortalidad durante las actividades de forrajeo y dispersión (Wellington 1946). Una disminución en la presión ambiental indica el advenimiento de una tormenta y, en general, va acompañada de cambios negativos en otras variables ambientales, tales como la temperatura, radiación solar, etc., que resultan en una alta mortalidad para los insectos de pequeño tamaño (Wellington 1946). Para este tipo de insectos, resulta adaptativo restringir las actividades a períodos con buenas condiciones ambientales, ya que reduce el riesgo de muerte (Dixon y Mercer 1983, Fournier y Boivin 2000). Hasta el momento, la mayoría de los estudios fueron realizados sobre insectos voladores y la influencia que tienen los cambios en la presión barométrica sobre el inicio del vuelo. Por ejemplo, en *Trichogramma petriosum* Riley y *T. evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) la reducción de la presión barométrica provoca la disminución en el inicio del vuelo, pero esta respuesta se revierte cuando la presión barométrica se estabiliza (Fournier et al. 2005). En el caso de los parasitoides, se estudió el efecto de los cambios de la presión barométrica sobre la búsqueda de pareja o la permanencia en un parche con hospedadores. Por ejemplo, en *Aphidius nigripes* Ashmead (Hymenoptera: Aphidiidae), parasitoide de muchas especies de áfidos, se encontró que cambios bruscos en la presión barométrica hacen que disminuya el número de machos que vuelan hacia los olores de la hembra en un túnel de viento (Marchand y McNeil 2000). Más aun, se ha encontrado para los parasitoides *A. nigripes* y *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae) que la respuesta a diferentes infoquímicos se ve reducida cuando la presión ambiental desciende (Marchand y McNeil 2000, Steinberg et al. 1992). En el caso de *Encarsia formosa* Gahan (Hymenoptera: Aphelinidae) la reducción de la presión barométrica

provoca inactividad de los insectos en experimentos de permanencia en un parche de alimentación (van Roermund y van Lenteren 1995). Este tipo de comportamiento también se ha visto en *V. canescens*, donde las avispas de la variedad *arrenotoca* (sexuales) que son frecuentes encontradas en los ambientes naturales modifican estos comportamientos, mientras que las *telitocas* (partenogénicas) no lo hacen, probablemente porque viven en lugares refugiados, como los silos de almacenamiento de harinas, que no están expuestos a fluctuaciones en las condiciones ambientales (Amat et al. 2006). Uno de los trabajos más importantes respecto de la influencia de los cambios en la presión barométrica sobre el comportamiento de búsqueda en parasitoides mostró que la disminución en la presión barométrica provocó que las hembras parasitoides de *Leptopilina heterotoma Thomson* (Hymenoptera: Eucoilidae) permanecieran más tiempo en un parche y aceptaran en mayor proporción el superparasitismo (Rotiberg et al. 1993).

Sin embargo, todos los estudios hasta el momento se realizaron sobre individuos adultos y principalmente en insectos voladores. En esta Capítulo, observamos que la larva de *M. ruficauda*, que es un insecto inmaduro que vive en el suelo, también tiene la capacidad de detectar cambios en la presión barométrica y utilizar esa información externa al momento de realizar la búsqueda del hospedador. De igual manera que para la búsqueda de alimento o pareja, en el contexto del proceso de parasitismo resulta ventajoso contar con la capacidad de detectar cambios de presión para evitar el riesgo de muerte por el advenimiento de tormentas. En el caso de *M. ruficauda*, una tormenta podría implicar un alto riesgo para la supervivencia ya que una lluvia podría producir el anegamiento de la tierra y podría provocar la muerte de la larva durante el forrajeo. Por otro lado, durante la tormenta, los poros del suelo se llenan con agua e interrumpen el gradiente de concentración de las moléculas del olor del hospedador, con lo cual carecería de sentido la realización de la búsqueda en este período. Finalmente, se observó que la larva de *M. ruficauda* cuenta con una estrategia de detección de las condiciones de los factores externos que le permiten adquirir información del ambiente. Este hecho se suma a que en función de su estado interno, la larva tiene la capacidad de decidir en que condiciones se orienta al hospedador, lo cual resulta en un conjunto de comportamientos de alto valor adaptativo.

CAPÍTULO 7

ESTRATEGIA DE USO DEL HOSPEDADOR Y RASGOS DE HISTORIA DE VIDA EN *Mallophora ruficauda*

Este Capítulo dio origen a la siguiente publicación: Crespo JE & Castelo MK, 2009. Life-history traits in a parasitoid dipteran species with free-living and obligate parasitic immature stages. *Physiological Entomology*, Vol. 35, 160-167.

Introducción

Es actualmente aceptado que la Selección Natural determina cuales individuos de una población sobrevivirán y se reproducirán; sin embargo, el número de individuos que sobreviven efectivamente está generalmente determinado por factores limitantes externos como la disponibilidad de alimento y espacio o la depredación. Estos factores influyen sobre la dinámica poblacional de los sistemas particulares (Saccheri y Hanski 2006). Existen modelos de dinámica poblacional de interacciones hospedador-parasitoide basados en estudios sobre los efectos del “host-feeding” en las decisiones de la asignación de los recursos (Collier et al. 1994, Briggs et al. 1995, Casas et al. 2005, Pelosse et al. 2007) y en la localización del hospedador (Godfray et al. 1994, Hassell 2000). A pesar que la mayor atención en la postulación de estos modelos se le ha dado a la heterogeneidad espacial, muchos menos estudios se han realizado sobre la asincronía temporal (Godfray et al. 1994). Este tipo de asincronía tiene consecuencias poblacionales importantes, dado que como resultado de la misma, una parte de la población del hospedador evita el riesgo de parasitismo porque se crea un efecto de refugio parcial. En este contexto, los factores involucrados en la sincronización de los sistemas hospedador-parasitoide son importantes en la determinación de la disponibilidad de los recursos.

Existen varias estrategias de sincronización entre los hospedadores y los parasitoides. Una de las estrategias más comunes es que el parasitoide ingrese en una diapausa o un estado de baja actividad cuando los hospedadores no se encuentran disponibles (Godfray 1994). Algunos parasitoides responden de manera pasiva a la fisiología del hospedador principalmente porque detectan cambios en el nivel de las hormonas asociadas con la diapausa y, como resultado, el parasitoide permanece en el primer estadio larval si el hospedador entra en diapausa (Fisher 1971, Tauber et al. 1983, 1986). Sin embargo, algunos estados inmaduros de los parasitoides son capaces de ajustar su desarrollo al de su hospedador o pueden regular el desarrollo del hospedador, realizando un uso eficiente de sus reservas energéticas y regulando su tasa de alimentación (Fisher 1971, Vinson 1976, Godfray 1994, van Nouhuys y Lei 2004).

Algunos endoparasitoides, principalmente koinobiontes, disminuyen la tasa de desarrollo hasta que el hospedador se encuentre completamente desarrollado (Godfray 1994). Se han realizado varios estudios sobre los mecanismos que subyacen a la localización del hospedador y la sincronización del desarrollo de especies de endoparasitoides con el de su hospedador. Sin embargo, muchos menos estudios se han conducido sobre la localización de hospedadores en parasitoides donde los huevos se depositan fuera del hospedador (Godfray 1994). En este último grupo, las hembras parasitoides no aseguran el encuentro entre la descendencia y el hospedador siendo la larva parasitoide la que debe encontrarlo por medio de una búsqueda activa o foresis (Godfray 1994). Finalmente, las estrategias de sincronización entre los parasitoides y sus hospedadores han sido estudiadas profundamente entre los himenópteros (Askew 1971, Tauber et al. 1983, 1986, Danks 1987, Bonsall y Hassell 1999, van Nouhuys y Lei 2004), siendo casi desconocidas para otros órdenes de insectos (Vinogradova 1991). Particularmente para los Asilidae, no se conocen los mecanismos subyacentes a la sincronización de las larvas con búsqueda activa con sus hospedadores.

El estado larval de *M. ruficauda* consta de cinco estadios que se desarrollan en distinto grado de asociación con su hospedador. Las larvas I de son dispersadas por el viento luego de nacer. Estas, al caer, se entierran en búsqueda del microhábitat de su hospedador (Castelo y Corley 2010, Castelo y Capurro 2000). La oviposición por parte de las hembras de *M. ruficauda* comienza desde mediados de diciembre hasta mediados de marzo, con un pico de máxima actividad durante enero (Castelo 2003). Por otra parte, el estadio susceptible al parasitismo del hospedador (i.e. tercer estadio larval de *C. signaticollis*) recién se encuentra disponible a mediados de febrero. Una vez ocurrido el parasitismo, la larva parasitoide permanece aferrada a su hospedador durante el período invernal como larva de segundo estadio. Luego, en la primavera, la larva parasitoide se desarrolla rápidamente y luego de un mes alcanza el quinto y último estadio larval antes que el hospedador empuepe. En muchos sentidos, la larva de segundo estadio de *M. ruficauda* se comporta como las larvas de primer estadio de las otras especies de parasitoides con oviposición fuera del hospedador, dado que es durante este estadio donde la búsqueda, aceptación y la competencia intraespecífica ocurren (Capítulos 3, 4 y 5). Debido a esto, se espera que las larvas de estadio II posean el mayor riesgo de muerte. La pregunta que surge de estos interrogantes es como logran las larvas de *M.*

ruficauda sobrevivir hasta que el estadio del hospedador preferido se encuentra disponible y cómo utilizan al hospedador luego de que el parasitismo ocurre.

El objetivo de este capítulo fue estudiar la estrategia de uso del hospedador durante el estado larval y caracterizar los rasgos de historia de vida de los estadios larvales de *M. ruficauda* de vida libre (no aferrados al hospedador o pre-parasitismo) y asociados o aferrados al hospedador (post-parasitismo). Particularmente se planteó estudiar la duración y supervivencia de cada estadio larval y de la pupa. La hipótesis de trabajo fue que el parasitoide tiene la capacidad de sincronizar su desarrollo con el de su hospedador extendiendo la duración del estadio larval involucrado en la búsqueda del hospedador.

Materiales y Métodos

Insectos

En este Capítulo se utilizaron larvas del parasitoide nacidas en el laboratorio, gusanos blancos sanos y gusanos parasitados obtenidos en el campo. Una vez recolectados los gusanos blancos e identificados (Ver Capítulo 2), se registró el número de larvas de *M. ruficauda* aferradas externamente a la cutícula por medio de una lupa binocular (16x). De esta manera, los hospedadores fueron clasificados de acuerdo al grado de parasitismo. Los gusanos blancos libres de parasitismo se utilizaron para realizar un parasitismo artificial en el laboratorio, mientras que los hospedadores ya parasitados fueron monitoreados desde ese momento y hasta el desarrollo completo del parasitoide. Así, se obtuvieron larvas parasitoides de tiempo de vida conocido luego del parasitismo.

Tasa de supervivencia estadio-específica y duración del estadio en presencia y ausencia de hospedadores

Este estudio se realizó en dos fases. La primera parte consistió en estudiar la supervivencia y la duración de los estadios larvales de *M. ruficauda* de vida libre, es decir, no aferrados al hospedador. Este experimento fue realizado por Crespo (2007) y se incluye aquí utilizando sus datos.

Luego, la segunda parte del estudio consistió en estudiar la supervivencia y la duración de los estadios larvales aferrados al hospedador. Para esta parte del estudio, se realizaron experimentos que se detallan en los párrafos siguientes.

Con el fin de determinar las tasas de supervivencia estadio-específica y la duración de cada estadio, se colocaron individualmente larvas recién nacidas en frascos (3 cm de radio, 5 cm de altura) con un papel de filtro humedecido como sustrato en la base. Se utilizaron 50 larvas por día durante 10 días consecutivos provenientes de desoves colectados durante la época que se da la mayor tasa de oviposición a campo (n=500). Durante el experimento, las larvas parasitoides permanecieron en ausencia de claves asociadas con los hospedadores o su entorno. Los frascos fueron mantenidos en oscuridad a temperatura (rango 18,6-29,8°C) similar a la de los campos donde los desoves fueron colectados. Cada individuo fue revisado diariamente registrándose el momento en que la ecdisis o la muerte ocurrieron. El experimento concluyó con la muerte de la última larva (Crespo 2007).

Luego, se estudiaron la supervivencia y duración de cada estadio larval asociado con el hospedador. Para llevar adelante este estudio, se utilizaron hospedadores parasitados colectados en el campo y parasitados artificialmente. Los individuos fueron observados semanalmente y nuevamente se registró el momento en que la ecdisis o la muerte tuvieron lugar. La frecuencia de observación en este caso fue intencionalmente menor (semanal) debido a que se ha observado que disturbios frecuentes de los hospedadores aumentan el riesgo de mortalidad luego de que el parasitismo ocurre (M. Castelo, datos no publicados). Para realizar el trabajo, en primer lugar se recolectaron a campo 111 hospedadores parasitados por larvas de *M. ruficauda* de todos los estadios. Por otro lado, se parasitaron 45 hospedadores en el laboratorio. Para obtener hospedadores parasitados artificialmente se colocó una larva de segundo estadio de *M. ruficauda* sobre el cuerpo de un individuo sano de tercer estadio de *C. signaticollis* y, luego de una semana, se comprobó la ocurrencia del parasitismo, y posteriormente se realizó el seguimiento. Este experimento concluyó cuando todas las larvas parasitoides habían muerto o un moscardón adulto emergía de la pupa correspondiente.

Finalmente, se estudiaron los casos particulares donde no era la larva parasitoide la que moría durante el experimento sino los hospedadores parasitados. Estos casos permitieron estudiar si la larva parasitoide luego de mudar al tercer estadio tiene la capacidad de sobrevivir en ausencia del hospedador. En los casos donde murió el hospedador parasitado se registró si la larva parasitoide lograba alcanzar el estadio siguiente o moría junto con el hospedador.

Análisis estadístico

Se midió el tiempo transcurrido hasta la muerte o muda de cada individuo para así obtener las curvas de supervivencia y duración para cada estadio larval y el estado de pupa. Para esto, se realizó un Análisis de Supervivencia de Kaplan-Meier (Rosner 1995). La proporción de individuos que sobrevivió cada estadio fue calculada y comparada por medio de Pruebas de Honestidad de Diferencia Significativa de Tukey (Zar 1996). Teniendo en cuenta que solamente las larvas parasitoides de segundo estadio son capaces de localizar a su hospedador, se consideró que las larvas de primer estadio que no lograban mudar no serían capaces de parasitar a un hospedador (Crespo 2007, Crespo y Castelo 2008). Por lo tanto, dado que las larvas que no logran mudar antes del décimo día de vida tienen una muy baja probabilidad de hacerlo los días siguientes, la supervivencia y duración del primer estadio larval se analizaron solamente para el período entre el nacimiento y el décimo día de vida. Finalmente, en los casos en que el hospedador parasitado era el que moría en lugar de la larva del parasitoide, se calculó la proporción de larvas que sobrevivían a ese estadio y se comparó la mortalidad de cada estadio con la del segundo estadio.

Resultados

Tasa de supervivencia estadio-específica y duración del estadio en presencia y ausencia de hospedadores

Se encontró que casi el 85% de las larvas de primer estadio son capaces de sobrevivir y mudar al segundo estadio en ausencia del hospedador o claves relacionadas. Bajo condiciones de laboratorio, las larvas de primer estadio mudan al siguiente estadio a los siete días de vida en

promedio (Tabla 7.1.). Por otro lado, no se encontró ninguna larva de segundo estadio que, en ausencia del hospedador, mude al tercer estadio (Tabla 7.1, Figura 7.1.). Dado que en este caso ninguna larva II mudó al tercer estadio, las curvas de supervivencia y duración del estadio son las mismas. Este resultado muestra que las larvas de segundo estadio deben localizar a su hospedador durante esta fase para continuar su desarrollo, y que estas pueden esperar la aparición del hospedador hasta 50 días luego de la muda utilizando sus propias reservas como fuente de alimento (Tabla 7.1.; Figura 7.1.; Crespo 2007).

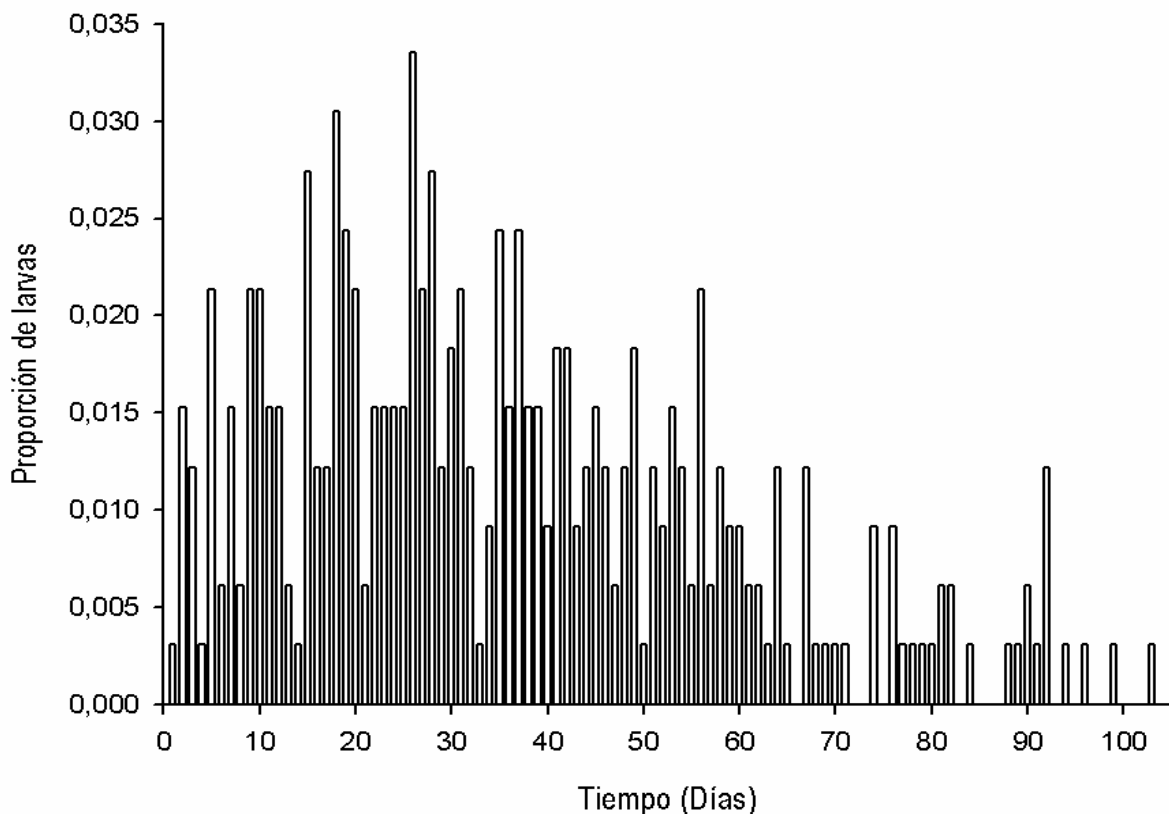


Figura 7.1. Distribución de frecuencias donde se observa la supervivencia de las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* que no parasitaron a un hospedador. Ninguna larva en estas condiciones mudo al tercer estadio.

En la segunda parte de este estudio (estadios asociados al hospedador II-V), se encontraron resultados muy diferentes en cuanto a la supervivencia y duración de los estadios. Con el fin de obtener larvas de *M. ruficauda* de tercer estadio, se parasitaron artificialmente hospedadores libres de parasitoides con larvas de vida libre de estadio II (n=45). Para este experimento también se utilizaron hospedadores parasitados naturalmente en el campo (n=30). Para determinar con precisión la

duración del segundo estadio larval de *M. ruficauda* luego del ataque se debe conocer el momento del inicio del parasitismo, lo cual se logra parasitando artificialmente a los hospedadores. Sin embargo, cabe destacar que un procedimiento con estas características puede influenciar el proceso natural. Con el fin de descartar diferencias en la dinámica de supervivencia entre hospedadores parasitados artificialmente (n=45) y parasitados naturalmente en el campo (n=12), se realizó un análisis de supervivencia del segundo estadio. Como resultado de este análisis se encontró que ambos grupos eran similares en cuanto al tiempo de supervivencia siendo, por lo tanto, analizados como un solo juego de datos (Prueba de Wilcoxon de Gehan, estadístico de prueba = 0,306, P=0,759; n=58).

La duración promedio del segundo estadio larval (teniendo en cuenta larvas de vida libre y de fase parasítica) fue de 141 días. Por otra parte, para el tercer, cuarto y quinto estadio la duración media fue de 4-5 días, con una variabilidad menor que la encontrada para el primer y segundo estadio (Tabla 7.1.). Es interesante remarcar que el parasitoide mata a su hospedador en el transcurso del cuarto estadio previo a mudar al quinto. En cuanto al quinto estadio larval, los resultados fueron similares a los dos estadios anteriores. Sin embargo, cabe destacar que todos los individuos empuparon en esta fase, siendo entonces el quinto estadio el de menor mortalidad (Tabla 7.1.). Finalmente, en cuanto al estado pupa, se encontró que su duración es de 24 días y tras ese período emergen los adultos (Tabla 7.1.).

Por último, se comparó la proporción de larvas que murieron en cada estadio con respecto a la del segundo estadio, encontrándose diferencias para todos los estadios (i.e primer, tercer, cuarto, quinto estadio y estado pupa; Prueba de Diferencia Significante de Tukey, P<0,001). No se encontraron diferencias en cuanto a la mortalidad para el primer, tercer y cuarto estadio respecto del segundo (Prueba de Dunnet: Q1=-0,63, P>0,05; Q3=0,72, P>0,05; Q4=-1,92, P>0,05; Qpupa=-0,30, P>0,05). En cuanto al quinto estadio larval, se encontró que posee una menor mortalidad que el segundo (Prueba de Dunnet: Q5=2,98, P<0,05).

Tabla 7.1. Duración y supervivencia de los distintos estadios larvales y del estado de pupa de *M. ruficauda*.

Estadio	Pico de muda (días)	Mediana de la duración del estadio; (inferior, cuartil superior)	Porcentaje de individuos que sobreviven	N	Descripción
I	7	7; (6, 9)	84,9	424	Larvas criadas en ausencia del hospedador
II	-	32; (19, 51)	0	360	Larvas criadas en ausencia del hospedador
II	109	109; (43,2, 158)	76,7	58	
III	4	4; (4, 8)	71,9	57	Larvas criadas en hospedadores natural o artificialmente parasitados
IV	4	4; (4, 12,66)	70,4	54	
V	5	5; (4, 11)	100	43	
pupa	24	24; (20,5, 29)	86,1	43	

Al analizar los casos en que el hospedador murió previamente a que la larva parasitoide mude al siguiente estadio, se encontró que el desarrollo de la larva parasitoide en los diferentes estadios está directamente ligado al hospedador y el parasitoide también muere. Sin embargo, se encontró que las larvas en alguno de los estadios son capaces de continuar su desarrollo cuando el hospedador muere. En cuanto al segundo estadio larval de *M. ruficauda*, se encontró que el hospedador debe estar vivo para que el parasitoide pueda mudar y sobrevivir (Tabla 7.2.). Para el tercer estadio se encontraron los mismos resultados, es decir que el hospedador debe estar vivo para que la larva parasitoide pueda mudar al cuarto estadio (Tabla 7.2.). En el caso del cuarto estadio de *M. ruficauda*, se observó que el 36,3% de los hospedadores murió, pero sin embargo, el 92,7% de las larvas parasitoides logró completar su desarrollo y mudar al quinto estadio (Tabla 7.2.). Este resultado muestra que el parasitoide no es estrictamente dependiente del hospedador durante el cuarto estadio. Finalmente, se encontró que todas las larvas de quinto estadio empuparon exitosamente, mostrando que, como el primer estadio larval, este estadio no es dependiente del hospedador. Es más, en ningún caso el hospedador logró sobrevivir cuando la larva parasitoide alcanzó este estadio.

Tabla 7.2. Porcentaje de larvas que sobrevivieron en cada estadio cuando el hospedador muere.

Estadio	Porcentaje de individuos que sobreviven luego de la muerte del hospedador	N	Descripción
II	0	71	Larvas criadas en hospedadores parasitados natural y artificialmente.
III	0	1	Larvas recolectadas en el campo que ya estaban parasitando a un hospedador.
IV	92,7	41	Larvas que ya estaban parasitando a un hospedador desde estadios anteriores.

Uso del hospedador

Se encontró que *M. ruficauda* hace un uso diferencial del hospedador a lo largo de todo su desarrollo larval. Durante el primer y último estadio, el parasitoide es independiente de su hospedador (Figura 7.2. AyF.). Durante el resto de los estadios larvales, el parasitoide se encuentra asociado al hospedador y alimentándose de sus tejidos. El segundo estadio es el de mayor duración (Figura 7.2. ByC.), mientras que el tercer estadio tiene la menor (Figura 7.2. D.). Luego, durante el cuarto estadio larval, el parasitoide mata a su hospedador (Figura 7.2. E.) y muda al último estadio larval (Figura 7.2. F.).






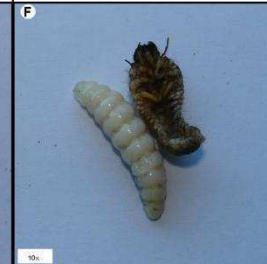
EI	EII		EIII	EIV	EV
					
I 4,35%	PD 19,87%	D 67,70%	D 2,49%	PD 2,49%	I 3,10%

Figura 7.2. Representación del uso del hospedador en cada estadio larval de *M. ruficauda*. La mayor parte del tiempo de desarrollo la larva parasitoide se encuentra como estadio II parasitando al hospedador. Abreviaturas: Estadios larvales: EI, Primero; EII, Segundo; EIII, Tercero; EIV, Cuarto; EV, Quinto; Desarrollo: I, Vida independiente del hospedador; PD, Parcialmente dependiente del hospedador; D, Dependiente del hospedador. Fotografías: José E. Crespo.

Discusión

En este capítulo se estudiaron los patrones de supervivencia y duración de los estados inmaduros de *M. ruficauda* y las estrategias de sincronización con su hospedador y uso de sus recursos. En ausencia de hospedadores, las larvas de *M. ruficauda* son capaces de mudar al segundo estadio. Esta capacidad es, hasta el momento, única entre los parasitoides. Sin embargo, si el hospedador no se encuentra disponible durante el segundo estadio larval de *M. ruficauda* el parasitoide muere. Durante el tercer estadio, *M. ruficauda* continúa siendo un parasitoide obligado dado que necesita a su hospedador para sobrevivir. Pero, una vez que alcanza el cuarto estadio larval, la asociación con su hospedador deja de ser tan fuerte y necesaria. La larva de *M. ruficauda* tiene la capacidad, luego de un tiempo de asociación con su hospedador, de sobrevivir y mudar al último estadio larval. Es durante el cuarto estadio que *M. ruficauda* mata a su hospedador. Finalmente el quinto estadio larval es independiente del hospedador y empupa luego de un corto período de tiempo.

Para este estudio se empleó una frecuencia de muestreo semanal entre observaciones para minimizar el riesgo de mortalidad de los hospedadores. Sin embargo, la duración de los estadios III, IV, y V solamente se pudo calcular como menor a una semana sin poder obtener un valor exacto o más ajustado. De cualquier forma, a pesar de haber obtenido valores aproximados, se ha podido establecer la enorme diferencia en cuanto a los tiempos de duración de estos estadios larvales respecto del segundo, el cual tiene la función principal de localizar al hospedador.

En general, la supervivencia de *M. ruficauda* resultó ser bastante baja. Si se tienen en cuenta 100 individuos a partir de larvas recién nacidas, solamente el 15% de ellas logra alcanzar el estado adulto (Figura 7.3.). Es más, la mortalidad más alta se encontró durante el segundo estadio larval, el cual es a su vez el más duradero y variable de todos. Curiosamente, a pesar de ser este el estadio donde el parasitismo y la competencia intraespecífica ocurren, no se encontraron diferencias en la supervivencia comparando el resto de los estadios larvales, a excepción del quinto estadio. El quinto estadio fue el de menor mortalidad de todos los estadios larvales, probablemente debido a que es independiente en su desarrollo del hospedador. Estos resultados indican que la mortalidad es similar entre los estadios larvales, sin embargo, la naturaleza artificial del estudio podría haber influido en

los resultados. En cuanto a la estrategia de sincronización, el segundo estadio larval de *M. ruficauda* tendría la capacidad de modular su propio desarrollo y de esta manera aumentar la probabilidad de parasitismo extendiendo la duración de este estadio con una alta supervivencia.

En todos los parasitoides estudiados hasta la fecha que poseen una fase de larva con búsqueda activa del hospedador, es el primer estadio el encargado de realizar estas tareas sin excepción (Godfray 1994, Feener y Brown 1997, Brodeur y Boivin 2004). Sin embargo, en *M. ruficauda*, la larva de primer estadio es capaz de mudar al segundo utilizando para ello sus propias reservas energéticas y sin estar asociada al hospedador. De esta manera, la larva de segundo estadio se comporta como las larvas de primer estadio del resto de los parasitoides conocidos con este tipo de búsqueda del hospedador (i.e. con una fase larval de búsqueda activa). Se ha propuesto que las larvas de todas las especies del género *Mallophora* son parasitoides mientras que son depredadoras el resto de las larvas de las especies de la familia *Asilidae* (Musso 1983). El primer estadio larval, entonces, podría ser un estado de transición entre el estado de huevo y el del estadio que realiza la búsqueda del hospedador, durante el cual el microhábitat del hospedador es localizado. En este contexto, sería ventajoso que el estadio en el cual ocurren la búsqueda del hospedador y el parasitismo tenga una duración larga y una alta supervivencia. Cabe destacar que en los parasitoides donde la hembra ovipone directamente en el hospedador, los huevos o la pupa son los estados que poseen una alta supervivencia (Godfray 1994).

En este estudio se encontró que el segundo estadio puede sobrevivir por muchos días utilizando para ello sus propias reservas pero su desarrollo depende de poder parasitar exitosamente a un hospedador. La variabilidad en la duración fue más alta para este estadio que para el resto de los estadios y que el estado de pupa. A pesar que este resultado puede no ser novedoso, debe remarcarse que es un factor clave en el estudio de la dinámica poblacional de esta especie debido a que es durante este segundo estadio larval donde alguno de los pasos necesarios para el parasitismo exitoso deben ocurrir (i.e. localización y aceptación del hospedador; van Alphen y Vet 1986, Brodeur y Boivin 2004). Una localización del hospedador eficiente es un factor central para la persistencia de las poblaciones de las especies que interactúan dado que pueden modificar la abundancia de los hospedadores y los parasitoides (Chesson y Murdoch 1986, Pacala et al. 1990, Godfray et al. 1994,

Hassell 2000). Además, la heterogeneidad, tanto espacial como temporal, puede promover la persistencia de de las poblaciones que estén interactuando (Wiegand y Wissel 1994, Briggs y Godfray 1995, Briggs y Hoopes 2004, Schley y Bees 2006).

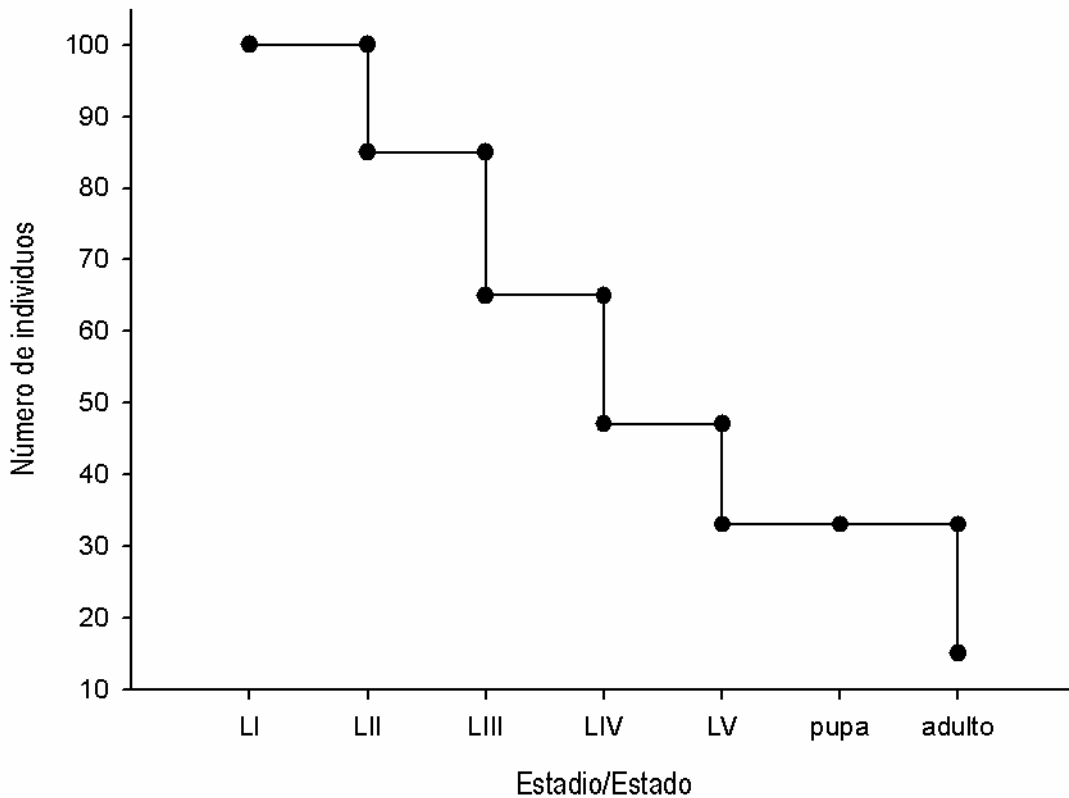


Figura 7.3. Representación esquemática del número de individuos de *M. ruficauda* que sobreviven desde el huevo al estado adulto. Los datos derivan de la supervivencia de cada período de desarrollo. Estadios larvales: LI, primero; LII, segundo; LIII, tercero; LIV, cuarto; LV, quinto; pupa, estado de pupa; adulto, estado adulto.

La asincronía temporal es un desfase entre la aparición del parasitoide en estado adulto y el principal pico de abundancia del hospedador. Esta asincronía puede ser un factor estabilizador porque puede influir en el grado del riesgo de parasitismo entre hospedadores individuales introduciendo un efecto de “refugio temporal” del parasitismo (Godfray et al. 1994). A pesar que algunos hospedadores pueden verse beneficiados por esta asincronía, dado que podrían escapar del parasitismo, sigue existiendo un cierto solapamiento. Lógicamente para que esto ocurra, tanto el parasitoide como el hospedador deben coexistir espacial y temporalmente. La estrategia más común que utilizan los parasitoides para superar esta falta de concordancia es mediante la diapausa (Godfray

1994). En el caso de *M. ruficauda*, aparentemente existiría otra estrategia que involucra una alta supervivencia durante el segundo estadio larval como mecanismo para superar la asincronía.

Las larvas de estos parasitoides han sido descritas por Musso (1981) como del tipo planidium. Este tipo de larvas posee mucha movilidad y, por ende, un alto metabolismo. Toda la energía disponible para la supervivencia y mantenimiento proviene de los huevos. Por lo tanto, es esperable una alta variación en la supervivencia de la larva debido a que está sujeta a las reservas energéticas que la hembra asigna a los huevos. A su vez, la energía disponible que posee la hembra para asignar al momento de la oviposición, depende de muchos factores entre los cuales están la cantidad de energía obtenida durante su propio estado larval, la competencia intraespecífica ocasionada por superparasitismo y la energía adquirida por medio de la alimentación en el estado adulto. De esta manera, si la larva que realiza la búsqueda del hospedador tiene la capacidad de asignar recursos a la locomoción o el mantenimiento somático dependiendo de su estadio interno, un incremento en la supervivencia podría aumentar las posibilidades de que esa larva encuentre a un hospedador. La supervivencia podría aumentar gracias al almacenamiento de reservas energéticas desde el huevo, que a su vez dependen de la inversión realizada por la hembra al momento de la oviposición. Por ejemplo, cuando la larva de *A. bilineata* se encuentra en presencia de un hospedador, la expectativa de vida disminuye, probablemente como resultado de un incremento en la actividad de búsqueda lo cual disminuye sus reservas energéticas (Royer et al. 1999). En contraste, los indicadores de una expectativa de vida disminuida pueden modificar las decisiones sobre la asignación de recursos favoreciendo un aumento en el esfuerzo reproductivo inmediato (Clutton-Brock 1984, Stearns 1992, Strand y Casas 2008). La oviposición en *Scotopteryx chenopoditata* Linneaus (Lepidoptera: Geometridae) aumenta en respuesta a claves asociadas con la expectativa de vida como daño o la presencia de depredadores (Javois y Tammaru 2004). En resumen, aparentemente *M. ruficauda* no se ajusta totalmente a la clasificación de los parasitoides ya que, a pesar que el parasitismo es uno de los requisitos para alguno de los estadios larvales, el desarrollo del primer y último estadio larval es independiente del hospedador.

El parasitoidismo ha evolucionado repetidamente a lo largo de todo el linaje de los dípteros (Eggleton y Belshaw 1993, Feener y Brown 1997, Yeates y Greathead 1997). Se ha propuesto que el

ancestro de los dípteros era un organismo saprófago y que mucho de los hábitos de vida son derivados de esta condición (Feener y Brown 1997). En la superfamilia Asiloidea, la condición primitiva de predadores subterráneos podría haber originado a las diferentes estrategias y hábitos de vida que se encuentran en la actualidad. A pesar que cada familia dentro del grupo de los Asiloidea es de hábitos depredadores, las especies de la familia Asilidae podrían estar posicionadas en algún lugar en el medio de una línea evolutiva que iría desde hábitos de vida depredadores a parasitoides (Gilbert y Jervis 1998). Musso (1983) describió el comportamiento de la larva de *Machimus rusticus* (Diptera: Asilidae) como microdepredadora, mientras que clasificó a la larva de *M. media* como ectoparasitoide. Este estudio realizado en *M. ruficauda* resalta la poca información que se tiene actualmente respecto de la evolución de las estrategias de vida que posee este grupo interesante, y que puede ayudar a desentrañar los procesos evolutivos que llevaron al parasitoidismo.

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN GENERAL

En esta Tesis se estudiaron los comportamientos y aspectos fisiológicos que llevan a la larva de *M. ruficauda* al parasitismo exitoso de su hospedador. Como se describió en la Introducción General, el parasitismo consta de cuatro etapas: localización del hábitat, localización, aceptación y uso del hospedador. En esta especie de parasitoide, las etapas comportamentales de localización del hábitat y del hospedador son compartidas entre la hembra y la larva. La hembra realiza una primera fase de la búsqueda del hábitat al seleccionar los sustratos elevados donde va a oviponer. Luego, son las larvas las que deben realizar la búsqueda activa del hospedador una vez que llegan al suelo. En la última fase del proceso de parasitismo, las larvas una vez que encuentran a un hospedador deben decidir si lo aceptan y concretan el parasitismo. En este trabajo, en primer lugar se estudiaron los mecanismos de orientación y órganos sensoriales involucrados en la búsqueda del hospedador. Los palpos maxilares de las larvas de segundo estadio tienen sensilias que son fundamentales en la detección y orientación hacia el hospedador y el mecanismo de orientación hacia el hospedador es por medio de klinotaxis. Es muy común que los insectos posean sensilias en los palpos maxilares, los cuales son frecuentemente utilizados en la detección o evaluación de alimento. En el caso de los parasitoides, existen estudios sobre las estructuras que utilizan las hembras que realizan la búsqueda del hospedador, y se conoce que las antenas son mayoritariamente los órganos responsables del reconocimiento y detección de hospedadores. Sin embargo, para los parasitoides con larvas que realizan una búsqueda activa del hospedador hasta el momento no se habían estudiado los órganos sensoriales involucrados. De esta manera, este trabajo hace un aporte significativo al conocimiento de como una larva que es dispersada azarosamente por el viento puede caer al suelo y encontrar eficientemente a su hospedador.

Luego, en esta Tesis se estudiaron aspectos de la fisiología del comportamiento de la búsqueda y detección del hospedador al evaluar si las larvas de segundo estadio de *M. ruficauda* tienen la capacidad de discriminar el estado del hospedador y detectar olores de hospedadores parasitados. La larva parasitoide tiene la capacidad de evaluar el estado de parasitismo de su hospedador por medio de claves químicas, pero esta capacidad sufre la influencia de factores internos y externos al momento de realizar la orientación y aceptación del hospedador. Se pudo demostrar que tanto la edad de la larva que forrajea como la densidad de coespecíficos en el ambiente tienen influencia y modifican la orientación y aceptación del hospedador. Al respecto, se encontró que la

cría de larvas jóvenes en un ambiente de alta competencia intraespecífica provoca que los parasitoides sean atraídos por y se aferren a hospedadores previamente parasitados, así como también a hospedadores de segundo estadio que poseen menor desarrollo. La influencia del estado fisiológico sobre los comportamientos relacionados con la reproducción, tales como búsqueda del hospedador y oviposición, y con la alimentación, ha sido estudiada en modelos clásicos de parasitoides himenópteros. Por ejemplo, avispas hembra deprivadas de azúcares aumentan los movimientos asociados con el forrajeo hacia flores y dejan de forrajear por hospedadores. Estos ejemplos, muestran la importancia del conocimiento del estado interno del animal experimental al realizar los experimentos ya que los comportamientos encontrados pueden ser muy diferentes. Este trabajo es también en este aspecto una contribución relevante al conocimiento a la capacidad de una larva parasitoide de discriminar la condición de su hospedador previo a parasitarlo, ya que solo existe un caso registrado en la literatura.

En cuanto a las condiciones ambientales, en esta Tesis se estudió el efecto de la presión barométrica sobre el comportamiento de localización del hospedador. En esos experimentos también se encontró que existe una fuerte influencia por parte de este factor sobre la actividad y orientación hacia el hospedador. Una disminución brusca en la presión barométrica del ambiente provoca que las larvas parasitoides detengan la búsqueda y se orienten al azar cuando les son ofrecidos olores del hospedador. Este resultado muestra por primera vez en un parasitoide de estas características, la influencia que tiene esta variable ambiental sobre la búsqueda del hospedador. Se ha visto en otros parasitoides que se interrumpen las actividades de forrajeo o que se intensifica la explotación de un parche probablemente porque el traslado hacia otro parche le confiere un mayor riesgo de vida. La modificación de los comportamientos en la búsqueda del hospedador o durante el forrajeo de alimento son comunes entre los parasitoides y es una estrategia adaptativa que les permite a los parasitoides sobrevivir hasta que las condiciones climáticas mejoren. Sin embargo, estos aspectos no han sido estudiados hasta el momento en larvas parasitoides que realizan la búsqueda, con lo cual esta Tesis hace un aporte original también en el conocimiento de estos procesos.

Finalmente, se estudió el uso que realiza la larva de *M. ruficauda* sobre *C. signaticollis*. Se encontró que la larva de *M. ruficauda* utiliza al hospedador de diferentes maneras a lo largo de su

desarrollo. El primer estadio es independiente del hospedador. Luego de mudar al segundo estadio, la larva es totalmente dependiente del hospedador ya que si no lo encuentra durante este estadio muere. El segundo estadio es el de mayor duración y una vez que alcanza el tercer estadio en adelante se acelera el desarrollo. El tercer estadio es también totalmente dependiente del hospedador ya que si este muere, también lo hace el parasitoide. Al mudar al cuarto estadio, se encontró que es aquí donde el parasitoide mata al hospedador y por consiguiente alcanza el último estadio sin depender del hospedador. Finalmente, al alcanzar el quinto estadio, los restos del hospedador son utilizados eventualmente y no existe una asociación muy fuerte. Este parasitoide es el único que se conoce hasta el momento con este tipo de estrategia de uso del hospedador, la cual es descrita en profundidad en este trabajo.

En esta Tesis se encontró que la larva de segundo estadio de *M. ruficauda* cuenta con la capacidad de detectar el estado de las condiciones bióticas y abióticas del microhábitat, la cual le permite tomar decisiones comportamentales que resultan adaptativas dentro del contexto de localización del hospedador. Específicamente, estos factores externos ejercen influencia sobre las estrategias y mecanismos que conducen hacia el parasitismo exitoso. Dado que la localización del hospedador en esta especie es compartida, es esperable que la hembra también cuente con mecanismos y estrategias de búsqueda a nivel de hábitat. En este sentido, se espera que exista una correspondencia entre los comportamientos en ambos estados del parasitoide y que ambos contribuyan simultáneamente a incrementar las oportunidades de monoparasitismo. Existe evidencia al respecto, ya que la hembra no realiza oviposiciones al azar en los pastizales, sino que los desoves se encuentran agregados en las zonas agrícolas donde se encuentra habitualmente el hospedador, independientemente de la presencia de abejas que son el alimento de los adultos. Además, en aquellos hábitats con presencia de gusanos blancos, las hembras tienen alta preferencia por los sitios de oviposición, y seleccionan aquellos que contribuyen a incrementar el monoparasitismo. Esto da la pauta que las hembras poseen alguna capacidad de detectar la presencia del hospedador a escala espacial de hábitat, y que en esta primera fase de la búsqueda facilitan el posterior encuentro de las larvas con el hospedador.

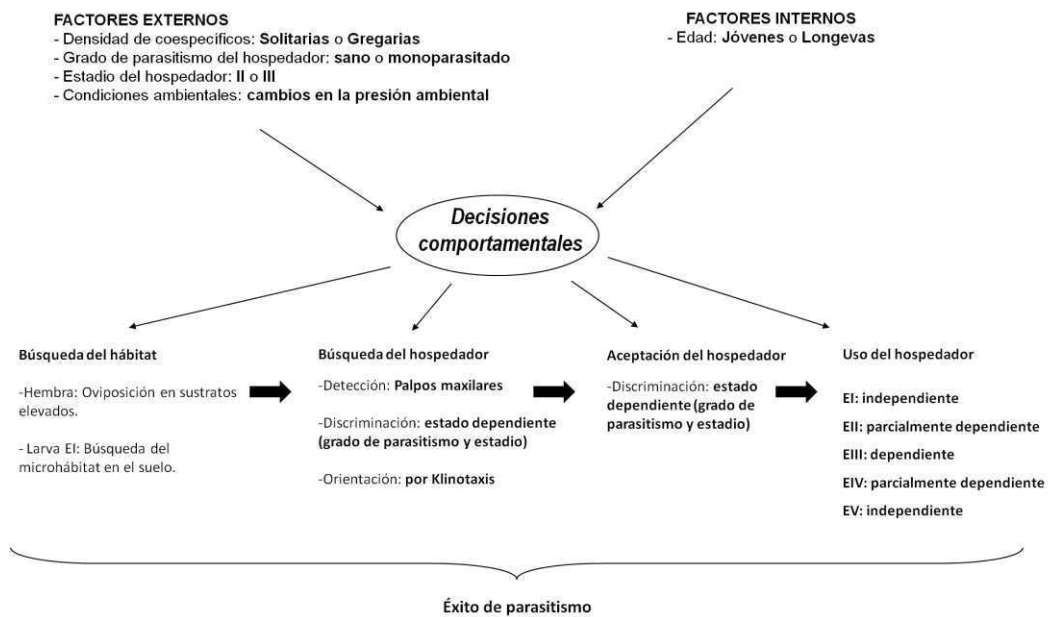


Figura 8.1. Esquema de los factores estudiados en esta Tesis y como influyen en los comportamientos de la larva de *M. ruficauda* asociados al parasitismo.

En conclusión, en este trabajo se estudiaron aspectos de la fisiología y ecología de los comportamientos que llevan a *M. ruficauda* a incrementar su éxito reproductivo, el cual contribuye a ampliar aspectos de su ciclo biológico hasta hoy desconocidos (Figura 8.1.). En cuanto a la búsqueda del hábitat, se sabía que la larva de primer estadio tiene la capacidad de detectar la presencia del hospedador. Una vez que muda al segundo estadio, la larva parasitoide detecta al hospedador por medio de claves químicas y ahora se sabe que además tiene la capacidad de discriminar el grado de parasitismo de su hospedador y de evitar el superparasitismo cuando las condiciones son favorables. Mas aun, los mecanismos de orientación hacia el hospedador son suprimidos cuando las condiciones atmosféricas indican el advenimiento de mal tiempo. Además, se pudo determinar que la larva durante su etapa de búsqueda evita a los hospedadores sub-óptimos como los monoparasitados o de segundo estadio larval. Sin embargo, en estas mismas condiciones pero cuando la densidad de coespecíficos es alta, estos comportamientos son modulados y la larva de *M. ruficauda* entonces es atraída y se aferra a los hospedadores sub-óptimos. Esta estrategia comportamental le proporciona a la larva una diversidad extra de hospedadores cuando el hospedador óptimo (*C. signaticollis* sano de tercer estadio) no se encuentra disponible. El conjunto de estas estrategias comportamentales le permite a la larva aumentar su eficiencia como parasitoide e incrementar la probabilidad de parasitar exitosamente un hospedador. Estos aspectos contribuyen directamente a aumentar el éxito reproductivo, contribuyendo a la persistencia tanto de la especie como del sistema parasitoide-hospedador.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

- Ali AD & Harivandi MA.** 1987. White grubs in lawns. Biology and Insect Management Series. Cooperative Extension, University of California. Leaflet 21442, 1p.
- van Alphen JJM.** 1980. Aspects fo the foraging behaviour of *Tetrastichus asparagi* Crawford and *Tetrastichus spec.* (Eulophidae), gregarious egg parasitoids of the asparagus beetles *Crioceris asparagi* L. and *C. duodecimpunctuata* L. (Chrysomelidae). I. Host species selection, host stage selection and host discrimination. *Netherlands Journal of Zoology*, 30: 307-325.
- van Alphen JJM & Vet LEM.** 1986. An evolutionary approach to host finding and selection. In J.K. Waage & D. Greathead, eds., *Insect parasitoids*, Academic Press, Londres, 23-61.
- van Alphen JJM & Visser ME.** 1990. Superparasitism as an adaptative strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 35: 59-79.
- van Alphen JJM, Bernstein C & Driessen G.** 2003. Information acquisition and time allocation in insect parasitoids, *Trends in Ecology and Evolution*, 18(2): 81-87.
- van Alphen JJM & Bernstein C.** 2008. Information acquisition, Infomation processing and patch time allocation in insect parasitoids. En: Wajnberg, E., Bernstein, C., & van Alphen, J.J.M., Editado por: *Behavioural Ecology of Insect Parasitoids*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 172-193.
- Alvarado L.** 1979. Comparación poblacional de “gusanos blancos” (larvas de Coleópteros Scarabaeidae) en tres situaciones de manejo. INTA, Generalidades, Carpeta de Producción Vegetal, tomo II, Inf. 16: 5 pp.
- Alvarado L.** 1980. Sistemática y bionomía de los estados inmaduros de coleópteros Scaraeibeidae que habitan en el suelo. Tesis Doctoral UNLP, Fac. Cs. Naturales y Museo. La Plata, Argentina: 199 pp.
- Alvarado L.** 1983. Daños de insectos del suelo en semillas de plantas cultivadas. INTA Estación Experimental Regional Agropecuaria Pergamino, Informe Técnico n° 180: 7 pp. Trabajo presentado al IX Seminario Panamericano de semilla, Bs. As., 1980.
- Alvarado L, Senigagliesi C & Marta L.** 1981. Composición poblacional de larvas de Scarabaeidae tras sucesivos cultivos de maíz. Informe de la Estación Experimental Regional Agropecuaria INTA Pergamino: 156-167.
- Alvarez Castillo HA, López AN, Vincini AM, Carmona D & Manetti PL.** 1993. Relevamiento de los insectos del suelo en cultivos de papa del sudeste bonaerense. SAGP-INTA, CERBAS, EEA Balcarce, Informe Técnico 118: 18 pp.
- Amat I, Castelo MK, Desouhant E & Bernstein C.** 2006. The influence of temperature and host availability on the host exploitation strategies of sexual and asexual parasitic wasps of the same species. *Oecologia*, 148 (1): 153-161.
- Artigas JN & Angulo AO.** 1980. Revisión del género *Mallophora* Maquart por sistemática alfa y taxonomía numérica (Diptera: Asilidae). *Gayana, Zoología* 43: 1-182.
- Artigas JN, Papavero N & Serra AL.** 1991. The american genera of Asilidae (Diptera): keys for identification with an atlas of Hermann (Lapriinae), with descriptions of two genera and three new species, and a catalogue of Neotropical species. *Gayana* 55(1): 53-85.
- Askew RR.** 1971. *Parasitic Insects*. Elsevier, New York, 316 pp.
- van Baaren J, Boivin G & Nénon JP.** 1994. Intra- and interspecific host discrimination in two closely related egg parasitoids. *Oecologia*, 100: 325-330.
- van Baaren J, Boivin G & Nénon JP.** 1995. Intraspecific hyperparasitism in a primary hymenopteran parasitoid. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36: 237-242.
- van Baaren J & Nenon JP.** 1996. Intraspecific larval competition in two solitary parasitoids, *Apoanagyrus* (*Epidinocarsis*) *lopezi* and *Leptomastix dactylopii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 81: 325-333.
- Barrantes ME.** 2009. Influencia de la especie de hospedador sobre la fisiología y comportamiento de las larvas del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Begon M, Townsend CR & Harper JL.** 2006. *Ecology: From Individuals to Ecosystems*. Blackwell Publishing, USA, 714 pp.
- Bell WJ, Vuturo SB, Silverman JM, Burgstahler AW & Wiegel LO.** 1978. Factors involved in the responses of the responses of male German cockroaches to synthetic sex pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 4: 495-501.

- Bell WJ, Kipp LR & Collins RD.** 1995. The role of chemo-orientation in search behavior. En: *Chemical Ecology of Insects 2*. Editado por: Cardé R & Bell WJ. Chapman & Hall, New York, 433 pp.
- Bernstein C & Jervis M.** 2008. Food-searching in parasitoids: the dilemma of choosing between immediate or future fitness gains. En: *Behavioral ecology of insects*. Editado por: Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen J. Blackwell, 445 pp.
- Bonsall MB & Hassell MP.** 1999. Parasitoid mediated effects: apparent competition and the persistence of host-parasitoid assemblages. *Research Population Ecology*, 41: 59-68.
- de Boer G.** 2006. The role of the antennae and maxillary palps in mediating food preference by larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 119: 29-38.
- Bourchier RS, & Smith SM.** 1996. Influence of environmental conditions and parasitoid quality on field performance of *Trichogramma minutum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80: 461-468.
- Briggs CJ, Nisbet RM & Murdoch WW.** 1995. Dynamical effects of host feeding in parasitoids. *Journal of Animal Ecology*, 64: 403-416.
- Briggs CJ & Godfray HCJ.** 1995. The dynamics of insect-pathogen interactions in stage-structured populations. *The American Naturalist*, 145: 855-887.
- Briggs CJ & Hoopes MF.** 2004. Stabilizing effects in spatial parasitoid-host and predator-prey models: a review. *Theoretical Population Biology*, 65: 299-315.
- Brodeur J & G Boivin.** 2004. Functional ecology of immature parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 49: 27-49.
- Cardé RT & Bell WJ.** 1995. *Chemical Ecology of Insects 2*. Chapman & Hall, New York, 433 pp.
- Cardé RT & Hagaman TE.** 1984. Mate location strategies of gypsy moths in dense populations. *Journal of Chemical Ecology*, 10: 25-31.
- Carmichael LM, Moore J & Bjostad LB.** 1993. Parasitism and decreased response to sex pheromones in male *Peripaneta americana*. *Journal of Insect Behavior*, 6: 25-32.
- Carmona DM, Vincini AM, López AN, Alvarez Castillo HA & Manetti PL.** 1994. Cambios estacionales en la comunidad de "insectos del suelo" en el cultivo de papa en el sudeste bonaerense. Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA – Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce. *Boletín Técnico*, 126: 15 pp.
- Casas J.** 1989. Foraging behaviour of a leafminer parasitoid in the field. *Ecological Entomology*, 14: 257-265
- Casas J, Pincebourde S & Mandon, N.** 2005. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*, 86: 545-554.
- Castelo MK.** 2003. Comportamiento de localización y patrones de explotación de hospedadores (Coleoptera: Scarabaeidae) por el moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Castelo MK, Ney-Nifle M, Corley JC & Bernstein C.** 2006. Oviposition height increases parasitism success by the parasitoid *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 231-243.
- Castelo MK y Capurro AF.** 2000. Especificidad y denso-dependencia inversa en parasitoides con oviposición fuera del hospedador: el caso de *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) en la pampa argentina. *Ecología Austral*, 10(1): 89-101.
- Castelo MK y Corley JC.** 2004a. Oviposition behaviour in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(5): 1050-1054.
- Castelo MK y Corley JC.** 2004b. Evaluación de la capacidad reguladora del moscardón cazador de abejas *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae) sobre los gusanos blancos del suelo (Coleoptera: Scarabaeidae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33(1): 59-78.
- Castelo MK y Corley JC.** 2010. Spatial density dependent parasitism and specificity in the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Austral Ecology*, 35: 72-81.
- Castelo MK y Lazzari CR.** 2004. Host-seeking behavior in larvae of the robber fly *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). *Journal of Insect Physiology*, 50(4): 331-336.
- Chapman RF.** 1998. *The insects: Structure and Function*. University Press, Cambridge, 749 pp.

- Cherry RH & Schueneman TJ.** 1998. Insect management in sugarcane. Department of Entomology, University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. ENY-406 Series.
- Chesson PL & Murdoch WW.** 1986. Aggregation of risk: Relationships among host-parasitoid models. *American Naturalist*, 127: 696-715.
- Clausen CP.** 1940. Entomophagous insects. McGraw-Hill, New York, Hafner, 688 pp.
- Clements AN & Bennett FD.** 1969. The structure and biology of a new species of Mallophora Macq. (Diptera: Asilidae) from Trinidad, W.I.- *Bulletin of Entomological Research*, 58(3): 455-463.
- Clutton-Brock TH.** 1984. Reproductive effort and terminal investment in iteroparous animals. *The American Naturalist*, 123: 212-229.
- Collier RT, Murdoch WW & Nisbet RM.** 1994. Egg load and the decision to host-feed in the parasitoid, *Aphytis melinus*. *Journal of Animal Ecology*, 63: 299-306.
- Copello A.** 1922. Biología del moscardón cazador de abejas (*Mallophora ruficauda* Wied.). *Physis*, 6: 30-42.
- Cranshaw WS & Zimmerman R.** 1998. Billbugs and white grubs. Home & Garden, 5.516, Colorado State University, Insect Series.
- Crespo JE.** 2007. Supervivencia y duración de los estadios larvales del parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae): El papel de la edad en el comportamiento de orientación hacia el hospedador. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Crespo JE y Castelo MK.** 2008. The ontogeny of host seeking behaviour in a parasitoid dipteran. *Journal of Insect Physiology*, 54(5): 842-847.
- Crouzel IS de.** 1965. Parasitismo en gusanos blancos en la República Argentina (Coleoptera, Scarabaeidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 27(1/4): 83-87.
- Crutchfield BA & Potter DA.** 1995. Damage relationships of Japanese beetle and southern masked chafer (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in cool-season turfgrasses. *Journal of Economic Entomology*, 88: 1049-1056.
- Danks HV.** 1987. Insect Dormancy: An Ecological Perspective. Biological Survey of Canada, Ottawa, Canada.
- Davis JJ.** 1919. Contributions to a knowledge of the natural enemies of Phyllophaga. *Bull. Ill. St. Nat. Hist. Surv.* (13): 53-138.
- Dennis DS & Knutson L.** 1988. Descriptions of pupae of South American robber flies (Diptera, Asilidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 81(6): 851-864.
- Desouhant E, Driessen G, Amat I & Bernstein C.** 2005. Host and food searching in a parasitoid wasp *Venturia canescens*: a trade-off between current and future reproduction. *Animal Behaviour*, 70: 145-52.
- Dethier VG.** 1980. Response of some olfactory receptors of the eastern tent caterpillar (*Malacosoma americanum*) to leaves. *Journal of Chemical Ecology* 6(1), 213-220.
- Dicke M & Sabelis MW.** 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds?. *Functional Ecology*, 2: 131-139.
- Dixon AFG & Mercer DR.** 1983. Flight behavior in the sycamore aphid: factors affecting take-off. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 33: 43-49.
- Doane JF and Klinge J.** 1978. Location of CO₂-receptive sensilla on larvae of the wireworms *Agriotes lineatus-obscurus* and *Limonius californicus*. *Annals of the Entomological Society of America*, 71, 357-363.
- Dusenbery DB.** 1992. Sensory Ecology. How organisms acquire and respond to information. New York: W.H. Freeman and Company.
- Eggleton P & Belshaw R.** 1993. Comparisons of dipteran, hymenopteran and coleopteran parasitoids: provisional phylogenetic explanations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48: 213-226.
- Feener DH Jr & Brown BV.** 1997. Diptera as parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 42: 73-97.

- Fink U & Volkl W.** 1995. The effect of abiotic factors on foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae*. *Oecologia*, 103: 371–378.
- Fisher RC.** 1971. Aspects of the physiology of the endoparasitic Hymenoptera. *Biological Reviews*, 46: 243-278.
- Fournier F & Boivin G.** 2000. Comparative dispersal of *Trichogramma evanescens* and *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in relation to environmental conditions. *Environ. Entomol.* 29: 55-63.
- Fournier F, Pelletier D, Vigneault C, Goyette B & Boivin G.** 2005. Effect of barometric pressure on flight initiation by *Trichogramma pretiosum* and *Trichogramma evanescens* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Environmental Entomology*, 34(6): 1534-1540.
- Ganesalingam VK.** 1974. Mechanism of discrimination between parasitized and unparasitized hosts by *Venturia canescens* (hymenoptera: Ichneumonidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 17(1): 36-44.
- Geller-Grimm 2010
- Gemignani EV.** 1930. Las especies argentinas del género *Mallophora* (Dipt.) y descripción de cuatro nuevas especies. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 13: 133-144.
- Gilber, F & Jervis M.** 1998. Functional, evolutionary and ecological aspects of feeding-related mouthpart specializations in parasitoid flies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 63: 495-535.
- Godfray HCJ.** 1994. *Parasitoids. Behavior and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ: 473 pp.
- Godfray HCJ & Hassell MP.** 1989. Discrete and continuous insect populations in tropical environments. *Journal of Animal Ecology*, 58: 153-174.
- Godfray HCJ, Hassell MP & Holt RD.** 1994. The population dynamic consequences of phenological asynchrony between parasitoids and their hosts. *Journal of Animal Ecology*, 63, 1-10.
- Groba HF y Castelo MK.** Chemical interaction between a dipteran parasitoid larva and its coleopteran host: A case of exploitation of the communication system during the searching behaviour? *Journal of Insect Physiology* (enviado).
- Gullan PJ & Cranston PS.** 2005. *The insects: An outline of entomology*. Blackwell Publishing, USA, 499.
- Harris MO & Foster SP.** 1995. Behavior and Integration. En: *Chemical Ecology of Insects 2*. Editado por: Cardé R & Bell WJ. Chapman & Hall, New York, 433 pp.
- Hassell MP.** 2000. *The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interactions*. Oxford University Press. 199 pp.
- Hurd H & Parry G.** 1991. Metacestode-induced depression of the production of, and response to sex pheromone in the intermediate host *Tenebrio molitor*. *Journal of Invertebrate pathology*, 58: 82-87.
- Iwasa Y, Suzuki Y & Matsuda H.** 1984. Theory of oviposition strategies of parasitoids. I. Effect of mortality and limited egg number. *Theoretical Population Biology*, 26: 205–27.
- Javois J & Tammaru T.** 2004. Reproductive decisions are sensitive to cues of life expectancy: the case of a moth. *Animal Behaviour*, 68: 249-255.
- Javois J & Tammaru T.** 2006. The effect of egg load on readiness to accept a low-quality host plant is weak and age dependent in a geometrid moth. *Ecological Entomology* 31: 597-600.
- Jervis MA & Kidd NAC.** 1986. Host-feeding strategies in hymenopteran parasitoids. *Biological Reviews*, 61: 395 – 434.
- Keil TA.** 1999. Morphology and development of the peripheral olfactory organs. En: *Insect Olfaction*. Editado por: B.S. Hansson (ed) Springer, New York, 451 pp.
- Keller M A.** 1990. Responses of the parasitoid *Cotesia rubecula* to its host *Pieris rapae* in a flight tunnel. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 57: 243–249.
- Kennedy JS.** 1977. Olfactory responses to distant plants and other odor sources. En: *Chemical Control of Insect Behavior: Theory and Application*. Editado por: H.B. Shorey and J.J. McKelvey, Jr. (eds.) John Wiley, New York.
- Kennedy JS.** 1978. The concepts of olfactory “arrestment” and “attraction”. *Physiological Entomology*, 3: 91-98.

- King BH & Skinner SW.** 1991. Proximal mechanisms of the sex ratio and clutch size responses of the wasp *Nasonia vitripennis* to parasitized hosts. *Animal Behavior*, 43: 23-32.
- Klowden MJ.** 2007. Physiological systems in insects. Academic Press, Elsevier, UK.
- Kuonen LPS & Cardé RT.** 1993. Effects of the moth size on velocity and steering during upwind flight toward a sex pheromone source by *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Insect Behavior*, 6: 177-193.
- LaSalle J & Gauld ID.** 1991. Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. *Redia*, 74: 315-334.
- Lazzari CR.** 2009. Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. *Advances in Insect Physiology*, 37: 1-58.
- van Lenteren JC.** 1972. Contact chemoreceptors on the ovipositor of *Pseudeucoila bochei* Weld (Cynipidae). *Netherlands Journal of Zoology*, 22: 347-350.
- van Lenteren JC.** 1981. Host discrimination by parasitoids. In: Norhlund DA, Jones RL & Lewis WJ (Eds.). *Semiochemicals: Their Role in Pest Control*, 1: 153-180. New York: Wiley & Sons. 306 pp.
- van Lenteren JC.** 1991. Encounters with parasitized hosts: To leave or not to leave a patch. *Netherlands journal of Zoology*, 41: 144-157.
- Lewis WJ, Vet LEM, Tumlinson JH, van Lenteren JC & Papaj DR.** 1990. Variations in parasitoid foraging behavior: Essential element of a sound biological control theory. *Environmental Entomology*, 19: 1183-1193.
- Lewis WJ & Martin WR Jr.** 1990. Semiochemicals for use with parasitoids: Status and future. *Journal of Chemical Ecology*, 16:3067-3089.
- Lizé A, Carval D, Cortesero AM, Fournet S & Poinso D.** 2006. Kin discrimination and altruism in the larvae of a solitary insect. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 273: 2381-2386.
- Lizé A, Cortesero AM, Atlan A & Poinso D.** 2007. Kin recognition in *Aleochara bilineata* could support the kinship theory of genomic imprinting. *Genetics*, 175: 1735-1740.
- López AN, Alvarez Castillo HA, Carmona D, Manetti PL & Vincini AM.** 1994. Aspectos morfológicos y biológicos de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera: Scarabaeidae). Centro Regional Buenos Aires Sur (CERBAS) INTA-Estación Experimental Agropecuaria, Balcarce. *Boletín Técnico*, 123: 18 pp.
- Louis M, Huber T, Benton R, Sakmar TP, Vosshall LB.** 2008. Bilateral olfaction sensory input enhances chemotaxis behavior. *Nature Neuroscience*, 11(2): 187-199.
- Lucchetta P, Desouhant E, Wajnberg E & Bernstein C.** 2007. Small but smart: the interaction between environmental cues and internal state modulates host-patch exploitation in a parasitic wasp. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61: 1409-1418.
- Mackauer M.** 1990. Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids. En: *Critical Issues in Biological Control*. Editado por: Mackauer, M., Ehler, L.E., Roland, J. Andover: Intercept.
- Mangel M.** 1993. Motivation, learning, and motivated learning. En: *Insect Learning*. Editado por: Papaj, D.R., Lewis, A.C. Chapman and Hall, New York.
- Marchand D & McNeill JN.** 2000. Effects of wind speed and atmospheric pressure on mate searching behavior in the aphid parasitoid *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Journal of Insect Behaviour*, 13(2): 187-199.
- McBrien H & Mackauer M.** 1991. Decision to superparasitize based on larval survival: competition between aphid parasitoids *Aphidius ervi* and *Aphidius smithi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59(2): 145-150.
- Messing RH, Klungness LM & Jang EB.** 1997. Effects of wind on movement of *Diachasmimorpha longicaudata*, a parasitoid of tephritid fruit flies, in a laboratory flight tunnel. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82: 147-152.
- Meyhöfer R & Casas J.** 1999. Vibratory stimuli in host location by parasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*, 45: 967-971.
- Mitchell WC & Mau FL.** 1971. Response of the female southern green stink bug and its parasite, *Trichopoda pinnipes*, to male stink bug pheromones. *Journal of Economic Entomology*, 64: 856-859.
- Monteith LG.** 1955. Host preference in *Drino bohemicu* Mesn. (Diptera: Tachinidae), with particular reference to olfactory responses. *Canadian Entomologist*, 87: 509-530.

- Musso JJ.** 1978. Recherches sur le développement, la nutrition et l'écologie des Asilidae (Diptera - Brachycera). These de Doctorat. Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille, Faculté des Sciences et Technique de Saint-Jérôme. 312 pp.
- Musso JJ.** 1981. Morphology and development of the immature stages of some robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis*, 7(1): 89-104.
- Musso JJ.** 1983. Nutritive and ecological requirements of robber flies (Diptera: Brachycera: Asilidae). *Entomologia Generalis*, 9(1/2): 35-50.
- Noldus LPJJ.** 1989. Semiochemicals, foraging behavior and quality of entomophagous insects for biological control. *Journal of Applied Entomology*, 108:425-451.
- Nordlung DA & Lewis WJ.** 1976. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 2: 211-220.
- van Nouhuys S & Lei GC.** 2004. Parasitoid and host metapopulation dynamics: the influence of temperature mediated phenological asynchrony. *Journal of Animal Ecology*, 73: 526-535.
- Nussenbaum AL.** 2007. Comportamiento de oviposición y estrategia de ovigenia en el parasitoide *Mallophora ruficauda* (Diptera: Asilidae). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Pacala S, Hassell MP & May RM.** 1990. Host-parasitoid associations in patchy environments. *Nature*, 344: 150-153.
- Papaj DR & Vet LEM.** 1990. Odor learning and foraging success in the parasitoid, *Leptopilina heterotoma*. *Journal of Chemical Ecology*, 16:3137-3150.
- Pelosse P, Bernstein C & Desouhant E.** 2007. Differential energy allocation as an adaptation to different habitats in the parasitic wasp *Venturia canescens*. *Evolutionary Ecology*, 21: 669-685.
- Pennacchio F & Strand MR.** 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, 51: 233-258.
- Potter DA.** 1998. *Destructive Turfgrass Insects: Biology, diagnosis and control*. Ann Arbor Press, Chelsea, MI, 336 pp.
- Quicke DLJ.** 1997. *Parasitic Wasps*. Chapman and Hall, London.
- Rabinovich M & Corley JC.** 1997. An important new predator of honey bees. The robber fly *Mallophora ruficauda* Wiedemann (Diptera-Asilidae) in Argentina. *American Bee Journal*, 137(4): 303-306.
- Rabinovich M & Quiroga RM.** 1995. Moscardón cazador de abejas. *Jornada de Sanidad Apícola*. Pigué. 5 pp.
- Redmond CT & Potter DA.** 2010. Incidence of turf-damaging white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae) and associated pathogens and parasitoids on Kentucky golf courses. *Environmental Entomology*, 39 (6): 1838-1847.
- Remedi de Gavotto AL.** 1964. Ciclo biológico de *Cyclocephala signaticollis* Burm. (Coleoptera, Scarabaeidae) y caracteres específicos de su larva. INTA. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, Serie 5, 1(10): 151-161.
- Ritcher PO.** 1940. Kentucky white grubs. *Ky Agric. Exp. Sta. Bull.* (401): 71-157.
- van Roermund HJW & van Lenteren JC.** 1995. Residence times of the whitefly parasitoid *Encarsia formosa* Gahan (Hym., Aphelinidae) on tomato leaflets, *Journal of Applied Entomology*, 119: 465-471-
- Roessingh P, Peterson SC & Fitzgerald TD.** 1988. The sensory basis of trail following in some lepidopterous larvae: contact chemoreception. *Physiological Entomology*, 13(2): 219-224.
- Roitberg BD, Mangel M, Lalonde RG, Roitberg CA, van Alphen JJM & Vet L.** 1992. Seasonal dynamic shifts in patch exploitation by parasitic wasps. *Behavioural Ecology*, 3:156-165.
- Roitberg BD, Sircom J, Roitberg CA, van Alphen JJM & Mangel M.** 1993. Life expectancy and reproduction. *Nature*, 364: 108.
- Roitberg BD & Mangel M.** 1988. On the evolutionary ecology of marking pheromones. *Evolutionary Ecology*, 2: 289-315.
- Rosner B.** 1995. *Fundamentals of Biostatistics*. Fourth edition. Duxbury Press, 682 pp.
- Royer L & Boivin G.** 1999. Infochemicals mediating the foraging behaviour of *Aleochara bilineata* Gyllenhal adults: sources

of attractants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 90(2): 199-205.

Royer L, Fournet S, Brunel E & Boivin G. 1999. Intra- and interspecific host discrimination by host-seeking larvae of coleopteran parasitoids. *Oecologia*, 118: 59-68.

Ruiz F. 1925. Voracidad de los Asfidos (Dípteros). *Revista Chilena de Historia Natural*, 29: 220-224.

Ryan MF. 2002. *Insect Chemoreception: Fundamental and Applied*. Kluwer Academic Publishers, New York, USA.

Saccheri I & Hanski I. 2006. Natural selection and population dynamics. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 341-347.

Salt G. 1935. Experimental studies in insect parasitism. III. Host selection. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 115: 413-435.

Salt G. 1961. Competition among insect parasitoids. In: Milthorpe, F.L. (Ed.), *Mechanisms in Biological Competition*. Symposia of the Society for Experimental Biology, XV. Academic Press, London 15: 96-119.

Salvadori JR. 1997. Manejo de corós em cereais de inverno. *EMBRAPA*, 3: 1-8.

de Santis L & Cornejo, LG. 1990. El moscardón cazador de abejas "Mallophora ruficauda". Conferencia de la Cooperativa apícola del oeste ltda. De Mones Cazón, 25 de Agosto de 1990: 17 pp.

Schley D & Bees MA. 2006. The role of time delays in a non-autonomous host-parasitoid model of slug biocontrol with nematodes. *Ecological Modeling*, 193: 543-559.

Schowalter TD. 2006. *Insect Ecology: An Ecosystem Approach*. Elsevier, San Diego, USA.

Seabrook WD, Kipp LR & Lonergan GC. 1989. University of New Brunswick Spruce budworm pheromone project, 1988 Progress Report, Department of Natural Resources and Energy, Province of New Brunswick, Fredericton, NB, Canada.

Siekman G, Tenhumberg B & Keller MA. 2004. The sweet tooth of adult parasitoid *Cotesia rubecula*: Ignoring hosts for nectar? *Journal of Insect Behavior*, 17: 459-76.

Simidchiev, DA. 1996. Compendio de apuntes sobre instrumentos meteorológicos para la formación de personal meteorológico de las clases III y IV. Organización Meteorológica Mundial, N° 622, Volumen I, 256 pp., Ginebra, Suiza.

Sirost E, Ploye H & Bernstein C. 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behavioural Ecology*, 8: 226-232.

Sirost E & Bernstein C. 1996. Time-sharing between host searching and food searching in solitary parasitoids: state-dependent optimal strategies. *Behavioral Ecology*, 7: 189-94.

Sisterton MS & Averill AL. 2002. Costs and benefits of food foraging for a braconid parasitoid. *Journal of Insect Behavior* 15: 571-88.

Smitley DR. 1996. Incidence of *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) and other scarab larvae in nursery fields. *Hortic. Entomol.*, 89: 1262-1266.

Stearns SC. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, New York.

Steinberg S, Dicke M, Vet LEM & Wainingen R. 1992. Response of the braconid parasitoid *Cotesia* (*Apanteles*) *glomerata* to volatile infochemicals: effects of bioassay set-up, parasitoid age and experience and barometric flux. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 63: 163-175.

Steinberg S, Dicke M & Vet LEM. 1993. Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. *Journal of Chemical Ecology*, 19: 47-59.

Stephens DW & Krebs JR. 1986. *Foraging Theory*. Princeton University Press, New Jersey.

Stireman JO III, O'Hara JE & Wood DM. 2006. Behavior, ecology and evolution of tachinid parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 51:525-555.

Strand MR & Casas J. 2008. Parasitoid and host nutritional physiology in behavioral ecology. En: *Behavioral ecology of insects*. Editado por: Wajnberg E, Bernstein C & van Alphen J. Blackwell, 445 pp.

Tauber MJ, Tauber CA & Nechols JR. 1983. Seasonal activity of parasitoids: Control by external, internal and genetic factors. *Diapause and Life Cycle Strategies in Insects*, (ed. by V.K. Brown and I. Hodek), pp. 87-108. Dr W. Junk, The Hague.

- Tauber MJ, Tauber CA & Nechols JR.** 1983 Seasonal activity of parasitoids: Control by external, internal and genetic factors. *Diapause and Life Cycle Strategies in Insects*, (ed. by V.K. Brown and I. Hodek), pp. 87-108. Dr W. Junk, The Hague.
- Tauber MJ, Tauber CA & Masaki S.** 1986. *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York.
- Tenhumberg B, Siekmann G & Keller MA.** 2006. Optimal time allocation in parasitic wasps searching for hosts and food. *Oikos*, 113: 121–31.
- Tricca G & Trujillo-Cenóz O.** 1980. The sexual behavior of the robber-fly *Mallophora ruficauda* Wied. (Asilidae, Asilinae) in normal and experimental conditions. *Physiology & Behavior*, 25(5): 627-632.
- Tumlinson JH, Lewis WJ & Vet LEM.** 1993a. Identificación de sus patrones por las avispa parasitas. *Investigación y Ciencia*, 200: 46-53.
- Tumlinson JH, Turlings TCJ & Lewis WJ.** 1993b. Semiochemically mediated foraging behavior in beneficial parasitic insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.22: 385-391.
- Turlings TCJ, Tumlinson JH, Eller FJ & Lewis WJ.** 1991a. Larval-damaged plants: Source of volatile synomones that guide the parasitoid *Cotesia marginiventris* to the micro-habitat of its hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 58: 75-82.
- Turlings TCJ, Tumlinson JH, Heath RR, Proveaux AT & Doolittle RE.** 1991b. Isolation and identification of allelochemicals that attract the larval parasitoid, *Cotesia marginiventris* (Cresson), to the microhabitat of one of its hosts. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 2235-2251.
- Udayagiri S & Jones RL.** 1992. Role of plant odor in parasitism of European corn borer by bronconid specialist parasitoid *Macrocentrus grandii* Goidanich: Isolation and characterization of plant synomones eliciting parasitoid flight response. *Journal of Chemical Ecology*, 18:1841-1855.
- Ueno T.** 2005. Effect of host age and size on offspring sex ratio in the pupal parasitoid *Pimpla* (=Coccygomimus) *luctuosa* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 50: 399 – 405.
- Vet LEM, Dejong R, van Giessen WA & Visser JH.** 1990. A learning-related variation in electroantennogram responses of a parasitic wasp. *Physiological Entomology*, 5: 243-247.
- Vet LEM, Lewis, WJ & Cardé RT.** 1995. Parasitoid foraging and learning. En: *Chemical Ecology of Insects 2*. Editado por: Cardé R & Bell WJ. Chapman & Hall, New York, 433 pp.
- Vet LEM, Hemerik L, Visser ME & Wäckers FE.** 2002. Flexibility in host-search and patch-use strategies in insect parasitoids. In: Lewis EE, Campbell JF & Sukhdeo MVK (Eds.). *The Behavioural Ecology of Parasites*. CAB International, 3: 39-64
- Vet LEM, Lewis WJ, Papaj DR & van Lenteren JC.** 2003. A variable-response model for parasitoid foraging behaviour. En: *Quality Control and Production of Biological Control Agents: Theory and Testing Procedures*. Editado por: van Lenteren, J.C. CABI Publishing, Wallingford, pp. 25–39.
- Vet LEM & Dicke M.** 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, 37: 141-172.
- Vet LEM & Groenewold AW.** 1990. Semiochemicals and learning in parasitoids. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 3119-3135.
- Villodas, R.** 2008. Hidrología. Guía de Estudio. Unidad II: Climatología y Meteorología I. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ingeniería, Ingeniería Civil. 30 pp.
- Vinogradova EB.** 1991. Diapause in flies and its control. *Proceedings of ZIN RAS*. St. Petersburg, Nauka.
- Vinson SB.** 1972. Competition and discrimination between two species of tobacco budworm parasitoids. *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 229-236.
- Vinson SB.** 1976. Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 21:109-133.
- Vinson SB.** 1984. How parasitoid locate their hosts: A case of insect espionage. In: Lewis T (Ed.). *Insect Communication*, 1: 325-348. 12th Symposium of Royal Entomological Society of London. Academic Press. London, 414 pp.
- Vinson SB.** 1985. The behaviour of parasitoids. In: Kerkut GA & Gilbert LI (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, pp 417-469. Pergamon Press, New York.

- Vinson SB & Iwantsch GF.** 1980. Host suitability for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, 25: 397-419.
- Wäckers FL & Lewis WJ.** 1999. A comparison between color, shape and pattern learning by the hymenopteran parasitoid *Microplitis croceipes*. *Journal of Comparative Physiology A*, 184: 387–393.
- Wajnberg É, Bernstein C & van Alphen J.** 2008. *Behavioral Ecology of Insect Parasitoids: From Theoretical Approaches to Field Applications*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Wang B, Ferro DN & Hosmer DW.** 1997. Importance of plant size, distribution of egg masses, and weather conditions on egg parasitism of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* by *Trichogramma ostriniae* in sweet corn. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 337–345.
- Weisser WW, Volkl W & Hassel MP.** 1997. The importance of adverse weather conditions for behaviour and population ecology of an aphid parasitoid. *J. Anim. Ecol.* 66: 386–400.
- Wellington WG.** 1946. The effects of variations in atmospheric pressure upon insects. *Can. J. Res. Sect. D.* 24:51-770.
- Wertheim I.** 1981. 40 años en el mundo maravilloso de las abejas. Dist. G.D.A., Buenos Aires, 238 pp.
- Whitman DW & Eller FJ.** 1992. Orientation of *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) to green leaf volatiles: Dose-response curves. *Journal of Chemical Ecology*, 18:1743-1753.
- Wiegand,T & Wissel C.** 1994. Host-parasitoid models in a temporally and spatially varying environment. *Ecological Modelling*, 75/76:161–170.
- Wyatt TD.** 2003. *Pheromones and animal behaviour: communicating by smell and taste*. Cambridge University Press, UK.
- Wylie HG.** 1965. Discrimination between parasitized and unparasitized housefly pupae by females of *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hym: Pteromalidae). *Canadian Entomologist*, 97: 279-286.
- Yeates DK & Greathead D.** 1997. The evolutionary pattern of host use in the Bombyliidae (Diptera): a diverse family of parasitoid flies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60: 145-185.
- Zacharuk RY & Shields VD.** 1991. Sensilla of immature insects. *Annual Review of Entomology*, 36: 331-354.
- Zar JH.** 1996. *Biostatistical analysis*, 3^a ed. Prentice-Hall, 662 pp.